

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Karolína Honzejková

Působení inhibitorů V-ATPasy na chemorezistentní linie neuroblastomu *in vitro*

Influence of V-ATPase inhibitors on chemoresistant neuroblastoma lines *in vitro*

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Konzultant bakalářské práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele, prof. MUDr. Tomáše Eckschlagera, CSc., a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli, panu prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc., a své konzultantce, prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při psaní bakalářské práce. Touto cestou děkuji také MVDr. Janu Hrabětovi, Ph.D. za podnětné rady, ochotu a čas při řešení bakalářské práce. Děkuji také celému kolektivu pracovníků laboratoře Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze – Motole za jejich rady, ochotu a vytváření příjemného pracovního prostředí.

Finanční podpora z grantu konzultanta a vedoucího GAČR č. 17-12816S a institucionální podpory MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.

Abstrakt

Nádorová onemocnění se řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí na celém světě a přes velký pokrok v léčebných postupech v posledních padesáti letech se stále jedná o závažný zdravotní problém. Proto je stále soustředěno velké úsilí na vývoj nových protinádorových léků a terapeutických přístupů. Neuroblastom (NBL) je nejčastější nádorové onemocnění u kojenců a čtvrté nejčastější u dětí. Úspěšnou léčbu značně komplikuje jeho heterogenita. Při chemoterapii je nežádoucím jevem léková rezistence. Jedním z mechanismů chemorezistence je akumulace slabě bazických protinádorových léčiv v lysosomech. Tato práce se zabývá měřením lysosomálního „uptaku“ těchto látek v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a této linii rezistentní vůči ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) za různých podmínek. Byla zavedena metoda stanovení kapacity (objemu) buněčných lysosomů pomocí měření intenzity fluorescence barviva specifického pro lysosomy, LysoTracker Red (LTR), a dále byla zkoumána schopnost bafilomycinu A, inhibitoru vakuolární ATPasy (V-ATPasy), potencovat účinky ellipticinu inhibicí jeho lysosomální akumulace.

Klíčová slova: neuroblastom, lysosom, vakuolární ATPasa, víceléková rezistence

Abstract

Tumor diseases are one of the most common causes of death worldwide. Despite the great advances in therapy in the last fifty years, this is still a serious health problem. Therefore, great efforts are still concentrated on development of new anti-cancer drugs and therapeutic approaches. Neuroblastoma (NBL) is the most common tumor in infants and the fourth most common in children. Successful treatment is greatly complicated by its heterogeneity. Chemoresistance is an undesirable phenomenon of chemotherapy. One of the chemoresistance mechanisms is the accumulation of weakly basic anticancer drugs in lysosomes. This work deals with the measurement of lysosomal uptake of these compounds in neuroblastoma cell lines UKF-NB-4 and derived, ellipticine-resistant, line (UKF-NB-4^{ELLI}) under different conditions. A method for determining the cell lysosomal capacity (volume) by measuring fluorescence intensity of lysosome-specific LTR dye was introduced and the ability of bafilomycin A, a V-ATPase inhibitor, to potentiate the effects of an anticancer agent ellipticine by inhibiting its lysosomal accumulation was investigated.

Keywords: neuroblastoma, lysosome, vacuolar ATPase, multidrug resistance

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
1. Úvod.....	9
1.1. Nádorová onemocnění u dětí	10
1.2. Neuroblastom	10
1.3. Léčba nádorových onemocnění pomocí chemoterapie	11
1.3.1. Doxorubicin.....	12
1.3.2. Ellipticin.....	12
1.3.3. Cis-platina	13
1.4. Distribuce léčiv v buňkách.....	14
1.4.1. Sekvestrace protinádorových léčiv v lysosomech.....	14
1.4.2. Chybná acidifikace lysosomů a její možné využití pro chemoterapii	15
1.5. Fosfolipidosa	17
1.6. Chemorezistence	18
1.7. V-ATPasa.....	21
1.7.1. Struktura V-ATPasy.....	22
1.7.2. Funkce V-ATPasy	22
1.7.3. Regulace V-ATPasy.....	23
1.8. Inhibitory V-ATPasy.....	23
2. Cíl práce	25
3. Materiál a metody	26
3.1. Materiál	26
3.2. Metody	27
3.2.1. Kultivace neuroblastomových buněčných linií	27
3.2.2. Kvantifikace počtu buněk	27
3.2.3. Příprava lyzačního pufru	27
3.2.4. Příprava vzorků buněčné linie UKF-NB-4 pro fluorimetrické stanovení koncentrace LTR	27
3.2.5. Příprava vzorků buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ^{ELLI} ovlivněných ellipticinem pro fluorimetrické stanovení koncentrace LTR a následné stanovení proteinů ..	28
3.2.6. Fluorimetrické stanovení koncentrace LTR	29
3.2.7. Stanovení koncentrace proteinů	30
3.2.8. Stanovení viability buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ^{ELLI} po ovlivnění ellipticinem a bafilomycinem.....	30
4. Výsledky	32

4.1.	Fluorescenční stanovení koncentrace LTR v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 při proměnlivé koncentraci LTR či proměnlivém počtu buněk	32
4.2.	Vliv bafilomycinu A na lysosomální „uptake“ LTR v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4	35
4.3.	Lysosomální „uptake“ LTR v neuroblastomových liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ^{ELLI} ovlivněných ellipticinem.....	36
4.4.	Stanovení vlivu bafilomycinu A a ellipticinu na viabilitu buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ^{ELLI}	38
5.	Diskuze.....	40
6.	Závěr	42
	Seznam literatury	43

Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát
BDNF	z anglického „brain-derived neurotrophic factor“
CADs	z anglického „cationic amphiphilic drugs“
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CLEAR	z anglického „Coordinated lysosomal expression and regulation“
CYP	cytochromy P450
DIPL	z anglického „drug-induced phospholipidosis“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
D-PBS	z anglického „Dulbecco’s phosphate-buffered saline“
ELLI	ellipticin
FBS	telecí sérum
HL-60	buněčná linie lidských leukemických buněk, z anglického „Human promyelocytic leukemia cells“
HR NBL	z anglického „high risk neuroblastoma“
IDB	intracelulární distribuce léčiv, z anglického „intracellular distribution-based“
IMDM	kultivační médium, z anglického „Iscove’s modified Dilbecco’s medium“
IMR-32	neuroblastomová buněčná linie
LTR	fluorescenční barva specifická pro kyselé organely, z anglického „LysoTracker Red“
MDR	víceléková rezistence, z anglického „Multidrug resistance“
mTORC1	protrínový komplex, z anglického „mammalian target of rapamycin complex 1“
MYCN	onkogen, z anglického „myelocytomatosis viral related, neuroblastoma derived gen“
NBL	neuroblastom
NGF	z anglického „nerve growth factor“
PAK	proteinkinasa A
PBS	sodno-fosfátový pufr s obsahem NaCl, z anglického „phosphate-buffered saline“

RAS	protoonkogen ras, z anglického retrovirus-associated DNA sequences
RFU	relativní fluorescenční jednotka
TFEB	transkripční faktor EB
TRK	z anglického „tropomyosin receptor kinase“ nebo „tyrosine receptor kinase“
UKF-NB-4	lidská neuroblastomová buněčná linie
UKF-NB-4^{ELLI}	lidská neuroblastomová buněčná linie rezistentní k ellipticinu
V-ATPasa	vakuolární ATPasa

1. Úvod

Nádorová onemocnění se řadí na přední příčky v příčinách úmrtí po celém světě. Přestože byly za posledních padesát let učiněny velké pokroky v léčbě nádorů, stále se jedná o závažný zdravotní problém, a proto je věnována obrovská snaha hledání nových diagnostických a terapeutických přístupů [1]. Pro zhoubné nádory je charakteristický nekontrolovaný růst buněk. Od výchozí expozice a prvních genetických změn často uběhnou roky, než je nádor detekovatelný. Tou dobou je nemoc mnohdy ve stádiu, kdy už je léčba obtížná, ne-li nemožná [2]. Nádorová onemocnění se navíc týkají stále nižších věkových ročníků, což je dáno oproti minulosti zásadně odlišnou skladbou potravy, ale také stresem, a kontaminací složek životního prostředí látkami s kancerogenním účinkem [3]. Časná diagnóza, univerzální přístup k zdravotnické péči a rozvoj možností terapie znamenal zásadní navýšení šancí na přežití a nyní se odhaduje, že až dvě třetiny nádorových onemocnění bude nakonec možné vyléčit, ovšem se zásadními rozdíly u jednotlivých typů nádorů [4].

Léčba nádorových onemocnění je komplikována především tím, že je nezbytné zcela zničit nikoliv buňky cizorodé, nýbrž buňky tělu vlastní. Ačkoliv se nádorové buňky nějakým způsobem odlišují od normálních buněk, a tím pádem by měly být rozpoznatelné imunitním systémem, často tyto odlišnosti nejsou dostačující a jsou imunitním systémem přehlíženy. Nádorové buňky také mohou být schopné využívat mechanismy, díky kterým jsou schopné inhibovat imunitní systém [3].

Chemoterapeutika jsou navrhována tak, že cílí na rychle se dělící buňky, tedy nejen na buňky zhoubných nádorů, ale také na normální buňky. Z toho důvodu se během posledních několika let dostala do popředí nová generace léčby nádorů – cílená (biologická) léčba. Stejně jako konvenční chemoterapie využívá farmakologicky aktivní látky, které inhibují růst, podporují apoptózu a zamezují šíření nádoru, ale jak už název napovídá, cílená terapie zasahuje do specifických proteinů zapojených v tumorogenezi. Cílená léčba využívající monoklonální protilátky, „small molecule inhibitors“ a imunotoxiny se stává užitečným nástrojem pro onkology, kdy jejich pacienti mají naději na delší a kvalitnější život, vyšší šance na přežití a nižší riziko nežádoucích účinků [5].

1.1. Nádorová onemocnění u dětí

Nádorová onemocnění se vyskytují ve všech věkových obdobích. Ta, která postihují děti a mladistvé, tvoří jen necelé jedno procento z veškerých nádorových chorob. Přesto jsou po poraněních a otravách nejčastější příčinou úmrtí ve věku mezi prvním až osmnáctým rokem. Nádorová onemocnění rozvíjející se v dětském věku se liší ve všech ohledech od nádorů postihujících dospělé.

U dětí se nejčastěji setkáváme s nádory vycházejícími z krvevorných tkání (leukemie, lymfomy), z mezodermy (nádory pojivových tkání), z neuroektodermy (nádory centrálního a periferního nervstva a z névů) a se smíšenými nádory složenými z tkání dvou nebo tří zárodečných listů [6].

1.2. Neuroblastom

Neuroblastom (NBL) je nejčastěji se vyskytující nádorové onemocnění u kojenců a čtvrté nejčastější u dětí [7]. Tento nádor tvoří 7 % nádorů dětského věku a jeho incidence je přibližně 10 nových případů na 1 milion dětí za jeden rok. Většina NBL je diagnostikována před pátým rokem věku, přičemž průměrný věk výskytu je 17 měsíců [8, 9]. Velká většina těchto nádorů vzniká sporadicky, ačkoliv jsou popsány i dědičné případy [8]. V České republice onemocní každý rok neuroblastomem přibližně 20–25 dětí [10].

NBL je nejčastějším extrakraniálním solidním nádorem u dětí. Vychází z nezralých, nediferencovaných buněk sympatiku – z buněk primordiální neurální lišty, které v embryonální fázi vývoje osidluje sympatická ganglia, dřev nadledvin a některé další oblasti. Primární tumor je tedy buď adrenální, nebo extraadrenální ze sympatických ganglií z oblasti od hlavy do pánve. Ojediněle vychází z ganglií ciliárních, sfenopalatinálních [10].

Typickým znakem NBL je jeho heterogenita, přičemž pravděpodobnost vyléčení závisí na mnoha faktorech. Mezi tyto faktory patří věk v době diagnózy, rozsah nemoci, biologie nádoru a další. Zatímco jistá část nádorů podléhá spontánní regresi, další skupina neuroblastomů na léčbu nereaguje nebo po počáteční příznivé odpovědi záhy recidivuje [11].

Ze současných poznatků vyplývá, že kritickou úlohu v různém chování neuroblastomu hraje rodina tyrosinkinasových (TRK) neurotrofinových receptorů. Neuroblastomy, které exprimují receptor pro tropomyosin kinasu A (TrkA), jsou biologicky příznivé a mají sklon ke spontánní regresi či diferenciaci podle přítomnosti nebo absence

svého ligandu nervového růstového faktoru (NGF) v mikroprostředí. Naopak, tumory exprimující receptor pro tropomyosin kinasu B (TrkB) vykazují zároveň amplifikaci genu odvozeného z neuroblastomu spojeného s virovou myelocytomatosou (*MYCN*) a jsou agresivní, často fatální. Tyto nádory také často exprimují TrkB ligand – neurotrofický faktor odvozený z mozku (BDNF), což má za následek autokrinní nebo parakrinní aktivaci záchranné dráhy. Pokud jsou NBL buňky vystaveny BDNF, podporuje to jejich přežití, rezistenci k lékům a angiogenezi těchto nádorů [12].

Ve vývoji sporadického neuroblastomu hraje důležitou roli řada genetických změn, které zahrnují aktivaci onkogenů, zmnožení, či ztrátu řady alel, změny v ploidii nádorových buněk a další. Jednou z nejdůležitějších změn v genomu neuroblastomových buněk je amplifikace onkogenu *MYCN*. Tento onkogen je amplifikován v buňkách neuroblastomů s nejagresivnějším chováním tzv. „high risk“ neuroblastomů (HR NBL) a je tedy negativním prognostickým znakem [10]. Amplifikace genu *MYCN* koreluje, jak bylo dokázáno, se špatnou prognózou u pacientů a je i v současné době používána jako jeden ze základních biomarkerů užívaných ke stratifikaci rizika. Metastázy se objevují asi u 50 % pacientů trpících NBL s častým šířením do kostní dřeně (70 %), kostí (55 %), lymfatických uzlin (30 %), jater (30 %), a mozku (18 %), přičemž *MYCN* přispívá ke všem aspektům metastázování – adhezi, motilitě, invazi a degradaci okolního prostředí [13].

Dalšími prognosticky negativními významnými změnami v genomu buněk neuroblastomu je delece části krátkého raménka chromozomu 1p (del 1p3.6) a zmnožení genetického materiálu na dlouhém raménku chromosomu 17q. Kromě toho je s prognózou spojen také obsah DNA neuroblastomu v tom smyslu, že nádory se zvýšeným obsahem DNA – tedy polyploidním karyotypem – jsou spojeny s příznivým průběhem u pacientů s NBL do 18 měsíců [14].

1.3. Léčba nádorových onemocnění pomocí chemoterapie

Na počátku 20. století se známý německý chemik Paul Ehrlich zaměřil na vyvíjení léků na léčbu infekčních chorob. Byl to on, kdo poprvé použil termín „chemoterapie“ a definoval ho jako využívání chemických látek pro léčbu nemocí. Nicméně, chirurgické zákroky a radioterapie dominovaly léčbě rakoviny až do 60. let 20. století. Tehdy začínalo být jasné, že míra vyléčení po radikálních lokálních léčebných postupech se dále nezlepšuje a činí pouze zhruba 33 %. Na vině byly zejména mikrometastázy, přítomné v době zahájení

terapie, které lokální léčba nepostihla. Nově dostupná data ukázala, že v kombinaci s chemoterapií by bylo možné vyléčit i pacienty s pokročilou nemocí. Chemické látky se začaly používat při léčbě v kombinaci s chirurgickými zákroky i radioterapií, což umožnilo komplexní terapii včetně adjuvantní terapie – tedy léčby předpokládaných mikrometastáz [15].

Většina chemoterapeutik používaných při léčbě zhoubných nádorů zasahuje do dělení buňky nebo syntézy DNA. Tyto sloučeniny mohou zasahovat buď fázově specificky pouze v určité části buněčného cyklu nebo mohou působit na celý buněčný cyklus. Na základě mechanismu působení můžeme chemoterapeutika dále rozdělit např. na alkylační činidla, antimetabolity, anthracykliny, inhibitory topoizomeras a rostlinné alkaloidy [5].

1.3.1. Doxorubicin

Doxorubicin známý také jako hydroxydaunorubicin je považován za jedno z nejúčinnějších cytostatik. Jeho schopnost postihovat rychle se dělící buňky a zpomalovat progresi nádoru je všeobecně uznávanou po mnoho desetiletí. Hlavním limitujícím faktorem jeho použití je toxicita pro nenádorové buňky lidského těla – postižení krvetvorby (anemie, trombocytopenie a leukopenie), postižení sliznic a vlasových folikulů a zvláště postižení myokardu (kardiotoxicita) [2]. Doxorubicin patří do skupiny anthracyklinů, jejichž struktura se skládá z necukerné a cukerné části. Necukerná část je složená z tetracyklického kruhu, ke kterému je cukerná část zvaná daunosamin připevněna glykosidickou vazbou [16]. Jeho funkce spočívá v interkalaci do DNA, vazbě mezi vlákna DNA tzv. „DNA-cross linking“ a inhibici enzymů topoisomerasy IIa a pravděpodobně i helikasy [17]. Tvorba kyslíkových radikálů se podílí hlavně na obávané kardiotoxicitě [18]. Anthracykliny se používají v léčbě řady nádorových onemocnění, jako jsou leukemie, lymfomy a solidní nádory například karcinom prsu, sarkomy měkkých tkání i kostí a také neuroblastom [19].

1.3.2. Ellipticin

Ellipticin je tetracyklický přírodní produkt izolovaný z rostlinného materiálu. Jedná se o látku ze skupiny alkaloidů, která spolu se svými deriváty působí jako účinné protinádorové léčivo [7]. Ellipticin indukuje zástavu buněčného cyklu a apoptózu. Tím nejzásadnějším mechanismem účinku je pravděpodobně zástava buněčného cyklu, způsobená poškozením DNA, kdy je ellipticin enzymaticky aktivován cytochromem P450 (dále CYP) a peroxidasami a následně v buňkách vytváří kovalentní DNA adukty [20].

Vznik aduktů, konkrétně 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu, indukuje genotoxicitu a tím buněčnou smrt [21]. Jejich hladina u NBL buněčných linií IMR-32 a UKF-NB-4 koreluje s toxicitou ellipticinu. U buněk obou těchto linií docházelo k jejich akumulaci v S-fázi buněčného cyklu, což naznačuje, že DNA adukty zasahují do procesu replikace DNA [20-23].

1.3.3. Cis-platina

Cis-platina je dobře známé chemoterapeutikum, které se používá pro léčbu mnohých druhů zhoubných nádorů, například karcinomu močového měchýře, spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, karcinomů plic a vaječníků, germinálních nádorů a neuroblastomu [24]. Mechanismus působení cis-platiny je spojen se schopností vytvářet vazby s purinovými basemi DNA, tím pádem interferovat s jejími funkcemi (replikace a transkripce) a s opravnými mechanismy DNA, což nakonec vyvolává v buňkách programovanou buněčnou smrt [25]. Kvůli rezistenci a mnohým nežádoucím vedlejším účinkům se používají i další léky obsahující platinu, například karboplatina nebo oxaliplatina [26].

Při vývoji dalších léčiv bylo odvozeno několik tisíc analogů, které byly syntetizovány a testovány na vlastnosti, které by zlepšily terapeutický index. Asi 13 z těchto analogů bylo hodnoceno v klinických testech, ale pouze karboplatina a oxaliplatina poskytly jasnou výhodu v porovnání s cis-platinou a dosáhly celosvětového schválení. V současné době je v klinických testech devět dalších analogů cis-platiny [24].

Karboplatina vykazuje nižší reaktivitu a pomalejší vazbu s DNA, ale tvoří stejné reakční produkty *in vitro* při ekvivalentních dávkách s cis-platinou. Snížená reaktivita omezuje vznik komplexů protein-karboplatina, které jsou vylučovány. Nižší míra vylučování karboplatiny znamená, že o to více je zadržováno v těle a tedy, že její efekty přetrvávají déle. Při srovnání s cis-platinou jsou největším benefitem karboplatiny její nižší nežádoucí účinky, především významné omezení nefrotoxických účinků, které většinou její použití limitují. Karboplatina je také méně účinná než cisplatin a poměr její dávkování vůči cisplatině je obvykle 4:1 [sumarizováno v cit. 27].

1.4. Distribuce léčiv v buňkách

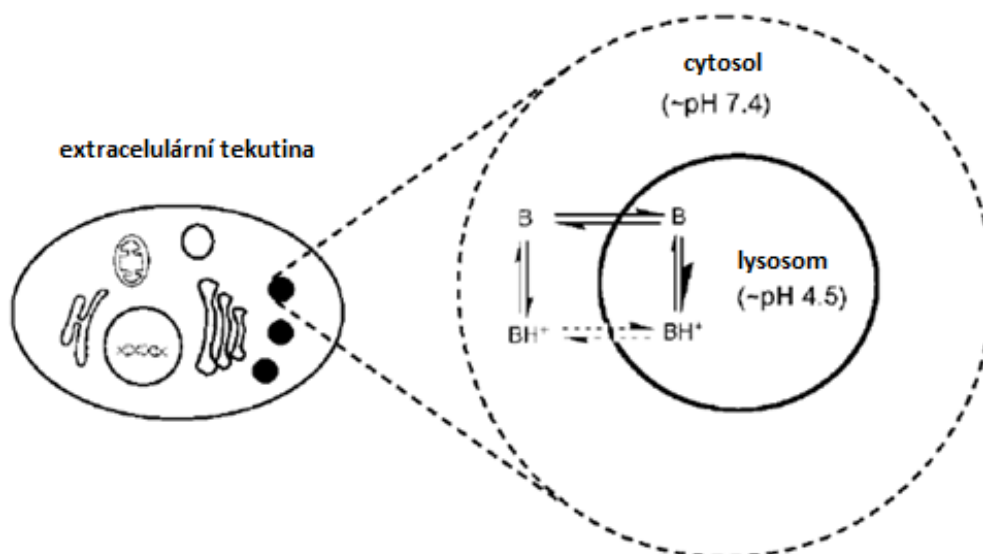
Správná distribuce protinádorových léčiv v buňce je extrémně důležitým výchozím předpokladem pro správnou funkci léčiva a naplnění jeho potenciálu. Savčí buňky jsou vysoce kompartmentalizované, pro léčebný úspěch je však třeba, aby intracelulární lokalizace léčiva byla do určité míry stejná jako jeho cíl, což může být právě vzhledem k vysokému stupni kompartmentalizace obtížné. Bylo zjištěno, že určité fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv mohou ovlivnit lokalizaci těchto látek uvnitř buněk [28], zároveň se také ví, že jedna látka může vykazovat rozdílnou lokalizaci uvnitř různých buněčných typů [29].

1.4.1. Sekvestrace protinádorových léčiv v lysosomech

Mnoho slabě bazických protinádorových léčiv se extenzivně akumuluje v lysosomech mechanismem zachytávání iontů [29]. Je všeobecně přijímáno, že sekvestrace slabě bazických léčiv (např. terapeuticky velmi využívaných aminů) se děje procesem zvaným „pH-partitioning“, přičemž schematické znázornění tohoto děje lze vidět na obrázku 1 (na straně 15). Volná báze účinné látky („B“) může volně prostupovat membránami, takže jakmile látka vstoupí přes plasmatickou membránu do cytosolu, okamžitě překračuje další membrány organel. Prostředí cytosolu je obvykle zhruba neutrální, takže báze, jejichž pKa se pohybuje kolem hodnoty 8, se v cytosolu vyskytují ve volné formě („B“) [30].

V okamžiku, kdy však tato báze překročí membránu kyselých organel, např. lysosomu, dochází k její ionizaci, a vzniká protonovaná forma („BH⁺“). Protonovaná forma obvykle špatně prochází membránou ven z organely a zůstává v organelle zachycená [30]. Po dobu, kdy je pH v organelle nízké, se léčivo akumuluje v lysosomu a může zde dosahovat velmi vysokých koncentrací, které mohou až několikrát převyšovat koncentraci léčiva v cytosolu buňky [31].

Podle cíle daného léčiva může mít tato sekvestrace v lysosomech pozitivní či negativní dopad na terapeutický účinek dané látky. Za předpokladu, že se cíl léčiva nachází právě v lysosomu, by byla sekvestrace jevem žádoucím jako je tomu např. u malárie [32].



Obrázek 1 - Ukázka mechanismu akumulace slabě bazických sloučenin uvnitř lysosomů. Bazické molekuly, jejichž pK_a se pohybuje kolem neutrálního pH, se vyskytují ve volné formě („B“). V okamžiku překročení membrány kyselé organely, např. lysosomu, dochází k jejich ionizaci a vzniku protonované formy („BH⁺“), která obvykle špatně prochází membránou ven z organely a zůstává v organelle zachycená. Upraveno podle [30].

Bohužel se však cíl léčiva mnohem častěji nachází v cytosolu nebo v jádře buňky a lysosomální sekvestrace tak zabraňuje interakci léčivo-cíl a tedy řádnému terapeutickému účinku [30]. Zvláště u cytostatik je cílem jejich působení jaderná DNA, takže lysosomální sekvestrace může být jedním z mechanismů způsobujících chemorezistenci nádorových buněk [33].

1.4.2. Chybná acidifikace lysosomů a její možné využití pro chemoterapii

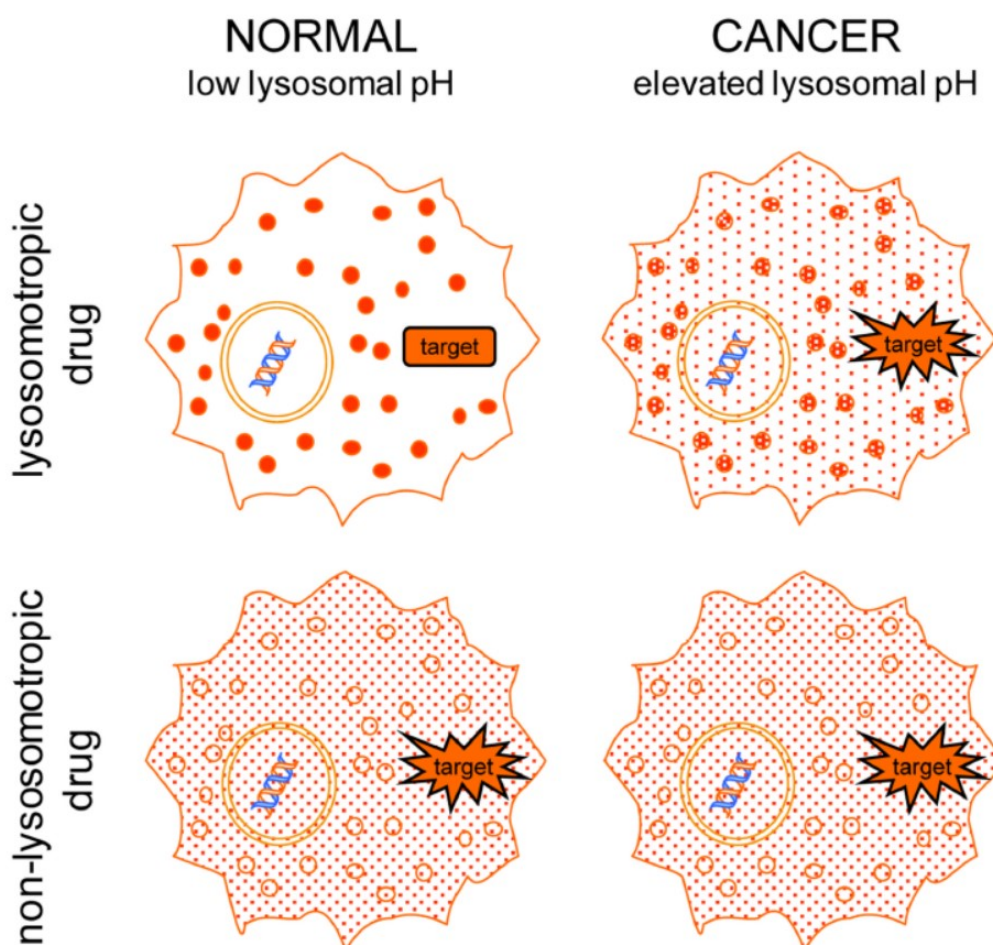
Jak již bylo zmíněno, to, jakým způsobem je látka distribuována uvnitř buněk a kde je lokalizována, je extrémně důležité pro efektivitu zvoleného terapeutika. Pro dosažení léčebného účinku je třeba, aby látka nejen vstoupila do buňky, nýbrž také aby byla dostatečně koncentrována uvnitř kompartmentu, ve kterém se nalézá cíl účinku [34].

To, jakým způsobem je látka uvnitř buňky distribuována, je ovlivněno strukturními a fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek. Tyto fyzikálně-chemické vlastnosti, především pK_a a parametr α (představuje poměr permeability lysosomální membrány pro daný lék

v ionizované ku neionizované formě), se podílí i na rozsahu lysosomální sekvestrace slabě bazických terapeutik [34].

V normálních buňkách se pH lysosomů pohybuje mezi hodnotami 4-5 [35], což může vést k takovému rozsahu sekvestrace, že téměř 100 % léčiva se nachází právě v lysosomu. Podíl koncentrace v lysosomu vůči koncentraci v cytosolu je tedy určován jak pK_a léčiva, tak pH gradientem mezi lysosomem a cytolem. Bylo zjištěno, že malé změny v lysosomálním pH mohou významně ovlivnit koncentraci léčiv v cytosolu, kde je lokalizováno mnoho cílů pro terapeutika [34].

Některé nádorové buňky vykazují chybnou acidifikaci lysosomů [36], což zmenšuje gradient pH mezi lysosomy a cytolem a následně způsobuje sníženou schopnost lysosomální sekvestrace slabě bazických látek v nádorových buňkách v porovnání s buňkami normálními, nenádorovými. Následkem toho dochází ke zvýšení koncentrace daných látek uvnitř cytosolu, čímž se zvyšuje možnost interakce terapeutika s cytosolárním nebo nukleárním cílem. Tento rozdíl v distribuci terapeutik mezi normálními a nádorovými buňkami s chybnou acidifikací může být použit jako základ pro cílenou intracelulární distribuci léčiv. Zatímco při tradičním cílení látek je obvykle veškerá snaha soustředěna na dosažení co nejvyšší koncentrace léčiv v nádorových buňkách a co nejnižší koncentrace v buňkách normálních, intracelulární na distribuci závislé cílení léků (IDB) je založeno na tom, že se léčiva mohou akumulovat stejně v nádorových i normálních buňkách, důležitý je však rozdíl v distribuci uvnitř těchto dvou typů buněk, způsobený právě chybnou acidifikací lysosomů nádorových buněk [34]. Právě zmíněný jev je schematicky znázorněn na obrázku 2 (na straně 17).



Obrázek 2 – **Schéma principu na distribuci závislého cílení léků (IDB).** Její význam spočívá v rozdílu intracelulární distribuce lysosomotropických léčiv u normálních buněk s nízkým lysosomálním pH a nádorových buněk se zvýšeným lysosomálním pH. Léčiva s lysosomotropickými vlastnostmi se budou u normálních buněk s nízkým lysosomálním pH extenzivně akumulovat uvnitř lysosomů a nebude tak docházet k interakcím s cytosolárním cílem. Totéž lysosomotropické léčivo se bude distribuovat odlišně v nádorových buňkách se zvýšeným lysosomálním pH a to tak, že koncentrace uvnitř lysosomů bude značně snížena, a naopak koncentrace v cytosolu poroste, což zlepší možnost interakce s cytosolárním cílem a tedy terapeutický účinek. Tento rozdíl neplatí pro látky bez lysosomotropických vlastností. Upraveno podle [34].

1.5. Fosfolipidosa

Fosfolipidosa vyvolaná léky (DIPL) je porucha, pro kterou je typická přítomnost mikroskopických subcelulárních struktur uvnitř buněk, jejichž vznik je vyvoláván některými léčivy [37]. Mezi léčiva, o kterých je známo, že vyvolávají DIPL, je nyní řazeno více než padesát chemických skupin včetně antibiotik, antidepresiv, antipsychotik, antimalarických a antiarytmických léků a dalších [38]. Mnoho z těchto skupin řadíme chemicky mezi kationické amfifilní látky (CADs), které vykazují určité společné fyzikálně-chemické

vlastnosti pramenící z jejich chemické struktury, jež je tvořena hydrofilním kruhem a hydrofobními částmi. Mnohé z těchto látek vykazují závažné nežádoucí účinky, nicméně vztah mezi nežádoucími účinky a DIPL stále není jasný [39].

Akumulace fosfolipidů a tvorba lamelárních tělísek je nejspíše důsledkem špatného fungování metabolismu fosfolipidů v lysosomech narušeného interakcí s CADs [40]. Zatímco v případě dědičných lysosomálních poruch narušuje správné fungování lysosomu specifický gen, v případě DIPL je tomu jinak [41]. Podle první hypotézy je nesprávné fungování způsobeno přímou interakcí CADs s fosfolipidy, následkem čehož vznikají „nestavitelné“ komplexy, které se akumulují a jsou skladovány ve formě lamelárních tělísek. Druhá hypotéza dává do souvislosti vznik lamelárních tělísek s inhibicí aktivity fosfolipas, a to buď přímou inhibicí, nebo interakcí CADs s fosfolipidovou dvojvrstvou lysosomu [39].

1.6. Chemorezistence

Ačkoliv je chemoterapie jedním z nejčastějších způsobů léčby zhoubných nádorů, poměrně často k použitým cytostatikům vzniká rezistence. Tato získaná a v mnoha případech dokonce mnohočetná léková rezistence (dále MDR) je častou příčinou selhání chemoterapie, které se projeví chemorezistentní recidivou. O MDR mluvíme tehdy, když nádorové buňky vykazují rezistenci vůči strukturálně i funkčně navzájem nepříbuzným léčivům. Byly popsány různé mechanismy, jejichž prostřednictvím může docházet k MDR, mezi nimi například snížená akumulace léčiv, zvýšené vylučování léčiv, zvýšená detoxifikace či zvýšená míra oprav DNA [42].

Jednou z příčin MDR je také výše popsaná lysosomální sekvestrace [43]. Lysosomy jsou součástí endosomálně-lysosomálního systému, který byl poprvé objeven Cristianem de Duveem v roce 1955, jak je popsáno v práci Andersona a Borlaka [39]. Jedná se o buněčné organely obklopené fosfolipidovou dvouvrstvou, které jsou schopné udržet si díky funkci „v-type H^+ -ATPasy“ kyselé prostředí. Obsahují přibližně čtyřicet různých hydrolytických enzymů, včetně proteas, nukleas, glykosidas, lipas, fosfolipas, fosfatas, sulfatas a dalších, které sehrávají klíčovou fyziologickou roli při rozkladu makromolekul zahrnujících nukleové kyseliny, lipidy, polysacharidy a proteiny [44]. Kromě toho se účastní dalších buněčných procesů, například recyklace vadných organel, exocytózy, apoptózy a autofagie [39, 42].

Lysosomy zachytávají hydrofobní aminy (často využívaná terapeutika) dějem, který je nejčastěji označován anglickým výrazem „lysosomal trapping“, tedy něco jako lysosomální zachytávání (vychytávání), nebo také pojmem lysosomální sekvestrace [45]. Lipofilní aminy mající vlastnosti slabých bazí za fyziologického pH volně difundují přes buněčné membrány. Jakmile však vstoupí do kyselých lysosomů, jsou protonovány. Tyto látky již nejsou schopné difundovat zpět a zůstávají zachycené uvnitř lysosomů v protonovaném stavu [46]. Právě popsáný děj byl popsán i u mnoha terapeuticky využívaných látek, například u antracyklinů doxorubicinu, daunorubicinu a mitoxantronu, imidazoakridinonů nebo sunitinibu [47].

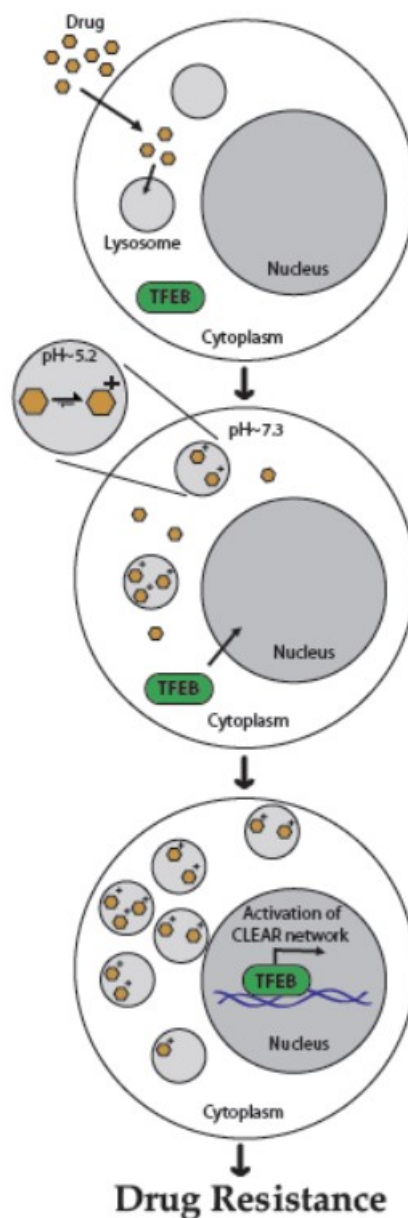
Lysosomy tedy způsobují to, že se látky nedostanou ke svým cílům uvnitř cytosolu, což může v konečném důsledku kvůli minimální koncentraci v žádoucím místě úplně zrušit cytotoxický efekt léčiva a způsobit MDR [45].

V jedné ze studií bylo zjištěno, že rezistence vůči sunitinibu, což je hydrofobní slabě bazický inhibitor tyrosin kinasy, o kterém se ví, že je také akumulován v lysosomech, koreluje s počtem lysosomů v buňce [48]. Zároveň bylo zjištěno, že vystavení nádorových buněk necytotoxickým, nanomolárním koncentracím terapeutik mitoxantronu a doxorubicinu, majících vlastnosti hydrofobních slabých bazí, vedlo k okamžité lysosomální biogenezi spojené s translokací transkripčního faktoru TFEB z cytoplazmy do jádra, vedoucí v konečném důsledku ke zvýšení exprese lysosomálních genů a zvýšení aktivity lysosomálních enzymů [49].

Chemoterapeutika s vlastnostmi hydrofobních slabých bazí jsou sekvistrována v lysosomech, což spouští lysosomální biogenezi a vede v důsledku toho k ještě většímu zachytávání látek v lysosomech. Vyhnutí se lysosomální sekvestraci tedy představuje jednu z možných strategií pro překonání chemorezistence [45].

Translokace TFEB byla rozpoznána jako příčina lysosomální biogeneze poměrně nedávno. TFEB je regulátor aktivující transkripci genů v tzv. „Coordinated Lysosomal Expression And Regulation“ (CLEAR) dráze, která je zodpovědná za biogenezi a funkci lysosomů [50]. Lysosomální biogeneze zprostředkovaná TFEB může být indukována různými stimuly, například farmakologickou inhibicí mTOR komplexu 1 (mTORC1). mTORC1 je kinasa, která zodpovídá za inhibici aktivity TFEB tím, že TFEB fosforyluje,

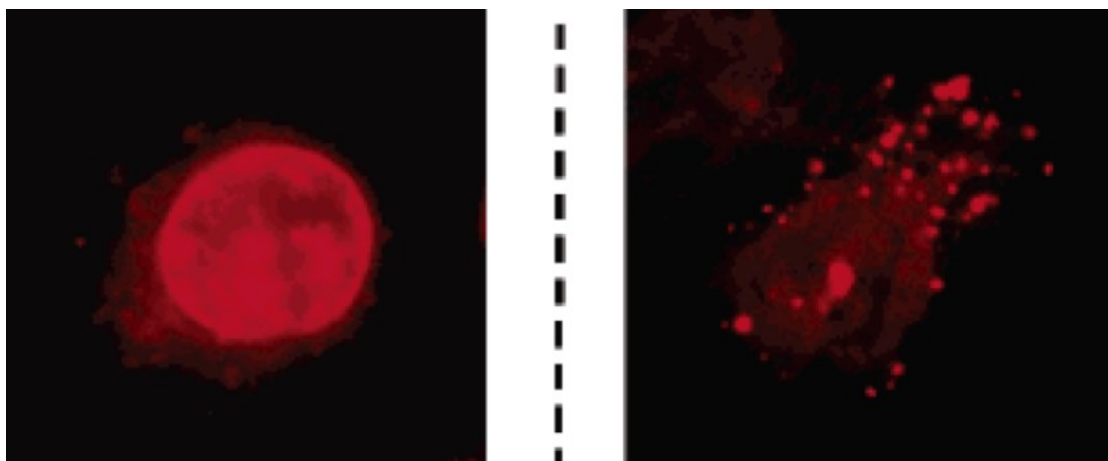
čímž zabraňuje jeho translokaci z cytoplazmy do jádra [45]. Schéma znázorňující vznik lékové rezistence, včetně role TFEB, je zobrazeno na obrázku 3.



Obrázek 3 – Schéma shrnující vznik lékové rezistence na bázi sekvestrace do lysosomů. Hydrofobní slabá báze vstoupí do lysosomu prostou difuzí, dojde k její protonaci a zůstává sekvestrována uvnitř lysosomu. Lysosomální sekvestrace látky následně spouští TFEB zprostředkovanou lysosomální biogenezi, čímž dojde k významnému navýšení počtu lysosomů a opětovné sekvestraci hydrofobních slabě bazických látek do těchto lysosomů vedoucí ke vzniku MDR. Upraveno podle [45].

Mnoho MDR nádorových buněk vykazuje zvýšenou schopnost sekvestrovat hydrofobní slabé báze do svých lysosomů v porovnání s buňkami citlivými na daná léčiva, což poukazuje na důležitou roli lysosomů při vzniku MDR, jelikož sekvestrace léčiv lysosomech omezuje schopnost daných látek efektivně intereagovat se svým cílem v buňce [42].

Významnou roli při sekvestraci léčiv do lysosomů hraje pH lysosomu – čím větší je pH gradient mezi lumen lysosomů a cytosolem, tím rozsáhlejší je sekvestrace. Zajímavé je, že některé nádorové linie vykazují chybnou acidifikaci lysosomů, konkrétně zvýšení lysosomálního pH, což je činí citlivější na hydrofobní slabě bazická léčiva, protože nejsou v takové míře sekvestrována v lysosomech. Tohoto poznatku lze využít při vývoji strategie pro distribuci léčiva uvnitř buněk. Vzhledem ke zmíněné závislosti na pH je také možné zlepšit účinnost vybraných terapeutik zvýšením lysosomálního pH některými alkalizačními činidly [42].



Obrázek 4 – Intracelulární lokalizace daunorubicinu v buněčné linii HL-60. Fluorescenční snímky buněk inkubovaných s daunorubicinem ukazují jeho rozdílnou intracelulární distribuci v senzitivních buňkách – akumulace v jádru (nalevo od přerušované čáry) a rezistentních buňkách – převážně lysosomální lokalizace (napravo od přerušované čáry). Převzato z [42].

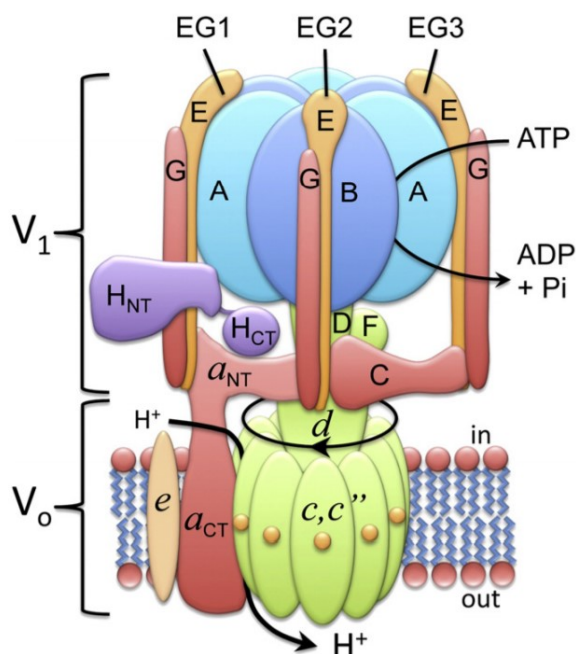
1.7. V-ATPasa

Vakuolární V-ATPasy (dále V-ATPasy) jsou membránové proteinové komplexy složené z více podjednotek [7], které jsou základními enzymy v každé eukaryotické buňce. Jsou to protonové pumpy získávající svou energii z ATP, které sehrávají důležité role v normálních i patologických procesech v buňce. Jsou součástí takových dějů, jako je

například vnitrobuněčný membránový transport, zpracování a degradace proteinů a hrají také roli při vstupu některých virů a toxinů do buněk či organel [51].

1.7.1. Struktura V-ATPasy

Struktura těchto velkých komplexů V-ATPasy je tvořena dvěma doménami, V_1 a V_0 složenými z více podjednotek, které jsou zodpovědné za hydrolýzu ATP a transport protonů v tomto pořadí. Periferní podjednotky tvoří doménu V_1 tedy katalytickou doménu, která je připevněná k cytosolární straně membrány. Kromě toho je doména V_1 vázána také k doméně V_0 , tedy integrální doméně, která vytváří prostor pro transport protonů [52]. Doména V_1 se skládá celkem z osmi podjednotek ve stechiometrii $A_3B_3C_1D_1E_3F_1G_3H_1$, zatímco doména V_0 obsahuje podjednotek pět ve stechiometrii $a_1c_9c''_1d_1e_1$ [53].



Obrázek 5 - Struktura a mechanismus funkce V-ATPasy. V-ATPasa se skládá z periferní domény V_1 zajišťující hydrolýzu ATP a z integrální domény V_0 mající na starost transport protonů. Doména V_1 je složena z 8 podjednotek (A-H), zatímco doména V_0 obsahuje podjednotek 5 ($a_1c_9c''_1d_1e_1$). V-ATPasa funguje rotačním mechanismem, kdy hydrolýza ATP způsobuje rotaci centrálního komplexu tvořeného podjednotkami D, F, d, c a c'' . Rotace glutamátových zbytků v proteolipidových podjednotkách c, c'' vůči „polo-kanálům“ vedoucím protony v podjednotce a způsobují transport protonů [53].

1.7.2. Funkce V-ATPasy

V-ATPasa funguje díky rotačnímu mechanismu kdy hydrolýza ATP v katalytických místech na pomezí podjednotek A a B způsobuje rotaci centrálního rotoru složeného z podjednotek D a F domény V_1 , který je spojený s prstencem proteolipidových podjednotek c a c'' domény V_0 [53]. Během transportu protonů dochází k reverzibilní protonaci glutamátových zbytků, které jsou součástí každé proteolipidové podjednotky. Protony se k těmto špatně přístupným glutamátovým zbytkům dostávají „polo-kanálem“ lokalizovaným na C-konci hydrofobní domény podjednotky a. Poté, co dojde díky hydrolýze

ATP k rotaci proteolipidového prstence, jsou glutamátové zbytky opět deprotonovány díky interakci s arginylovým zbytkem umístěným v podjednotce a, a následně odcházejí prostřednictvím „polo-kanálu“ v podjednotce a na lumenální stranu [54, 55].

1.7.3. Regulace V-ATPasy

Je obecně přijímáno, že reverzibilní disociace V-ATPasy je fyziologický mechanismus, který je, jak se zdá, universální napříč eukaryoty a byl detekován v tak rozdílných organismech, jako jsou kvasinky, hmyz či savci [51]. Oddělení domény V_1 od V_0 je důležitým mechanismem, který inhibuje V-ATPasový protonový transport. Buněčný mechanismus řídící regulaci V-ATPasy prostřednictvím reverzibilního rozkládání a skládání zatím není zcela jasný, například u kvasinek je rozkládání V-ATPasy spojeno se změnami pH cytosolu, RAS/cAMP/PK drahou a glykolýzou [56]. Rozložení komplexu V_1V_0 u kvasinek je vyvoláno nedostatkem glukosy. V takovém případě je podjednotka C domény V_1 uvolněna do cytoplazmy, což způsobí oddělení zbytku domény V_1 od domény V_0 . Tento rozklad úplně inaktivuje V-ATPasovou pumpu, protože doména V_1 nemůže bez domény V_0 hydrolyzovat ATP a naopak doména V_0 nemůže bez domény V_1 transportovat protony [52]. Následkem toho nemohou být protony přenášeny z cytoplazmy do lumen vakuoly, dochází k alkalizaci lumen a acidifikaci cytosolu. Po přidání glukosy je komplex opět složen dohromady, obnovuje se jeho funkce a následně vakuolární a cytosolární pH homeostáza [52].

1.8. Inhibitory V-ATPasy

Je známo již delší dobu, že nesprávné fungování V-ATPasy je spojeno se zvýšeným výskytem některých chorob, např. osteoporózy, mužské infertility nebo renální acidosis [57]. Z toho důvodu se V-ATPasa stala objektem zkoumání a je považována za atraktivní cíl při léčbě nádorů či osteoporózy. Ovšem, aby bylo možné porozumět významu V-ATPasy v rozvoji chorob a následně navrhnout účinné léky vhodné k léčbě těchto chorob, je nezbytné zjistit mechanismus funkce enzymu, k čemuž se tradičně využívá enzymových inhibitorů [58].

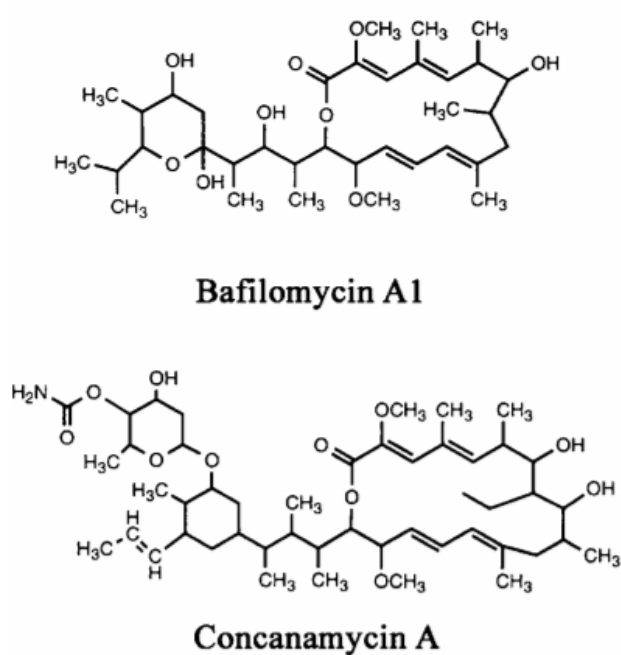
K prvním pokusům blokovat funkci V-ATPasy došlo poté, co byly na počátku 80. let objeveny specifické inhibitory V-ATPasy bafilomycin a konkanamycin Hensensem a kolektivem [59]. Později byly objeveny další molekuly, které více či méně inhibují V-ATPasu prostřednictvím různých mechanismů [60].

V současnosti známé inhibitory V-ATPasy je možné rozřadit následovně do pěti rodin:

1. rodina: plekomakrolidická antibiotika – konkanamycin a bafilomycin
2. rodina: benzolaktonové enamidy
 - a. salicylhamidy
 - b. apikulareny
 - c. lobatamidy
 - d. oximidiny
 - e. kruentaren
3. rodina: archazolid
4. rodina: indolyly
5. poslední generace V-ATPasových inhibitorů, například NiK12192

[60]

Nejvíce prozkoumanými jsou inhibitory patřící k první rodině. Jedná se o látky s 18-ti členným laktonovým kruhem, které byly izolovány z druhu *Streptomyces*. Zdá se, že se tyto látky vážou na podjednotku a domény V_0 a intereagují s její podjednotkou c. Bafilomycin A1 a konkanamycin A v nanomolárních koncentracích selektivně inhibují V-ATPasu, zároveň také inhibují růst a indukují apoptózu u některých lidských buněčných linií [60].



Obrázek 6 – Strukturní vzorce bafilomycinu A1 a konkanamycinu A [61]

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit vliv inhibitorů V-ATPasy na lysosomální „uptake“ fluorescenční barvy LysoTracker Red (LTR) specifické pro kyselé organely, tedy převážně lysosomy, v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a od ní odvozené linie rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}). K dosažení výsledků bylo postupováno podle následujících kroků:

- Zavedení a standardizace metodiky měření „uptake LTR“ s cílem stanovit kapacity lysosomů pro toto specifické barvivo
- Vlastní měření lysosomálního „uptaku“ v buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ovlivněných bafilomycinem A, ellipticinem či jejich kombinací
- Stanovení viability buněk za rozdílných experimentálních podmínek

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Bio-Rad (USA): souprava pro stanovení koncentrace proteinů (DC Protein Assay Reagent A - , Reagent B, Reagent S)

Fluka (Německo): Igepal CA 630

Gibco (USA): sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), telecí sérum (fetal bovine serum FBS), „Iscove´s modified Dulbecco´s“ médium (IMDM) s glutaminem

Penta (ČR): Chlorid sodný

Sigma-Aldrich (USA): ellipticin, Tris base, bafilomycin A

Thermo Fisher Scientific (USA): LysoTracker Red (LTR), alamarBlue™ Cell Viability Reagent

Neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 byla darem profesora Jindřicha Činátla, DrSc. z Goetheho Univerzity ve Frankfurtu nad Mohanem. Linie UKF-NB-4 byla získána z kostní dřeně infiltrované recidivou neuroblastomu vysokého rizika s amplifikací MYCN. Linie UKF-NB-4^{ELLI} byla připravena dlouhodobou kultivací linie UKF-NB-4 se stoupajícími dávkami ellipticinu v laboratoři Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol [62].



Obrázek 7 – Snímky lidských neuroblastomových linií UKF-NB-4 (vlevo) a UKF-NB-4^{ELLI} (vpravo). Pořízeno na mikroskopu Olympus IX51, zvětšeno 200x.

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace neuroblastomových buněčných linií

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} byly kultivovány v „Isove's Modified Dulbecco's“ médiu (IMDM) doplněném 10% telecím sérem (FBS). Kultivace byla prováděna v inkubátoru Jouan IGO 150 (USA) při 37°C, 95% vlhkosti v atmosféře s 5% CO₂. „Pasážování“ buněčných linií bylo prováděno v pravidelných intervalech 2x týdně. Buňky byly promyty PBS a z povrchu kultivačních lahví byly uvolněny použitím 0,05% roztoku trypsinu v PBS. Poté byly buňky resuspendovány v dostatečném množství média. Pro kultivaci buněčných linií byly používány lahvičky o kultivační ploše 25 cm² a 75 cm².

3.2.2. Kvantifikace počtu buněk

Po trypsinaci a resuspendování buněk v přiměřeném množství média bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze, která byla pipetována do plastového sklíčka určeného pro BIO-RAD TC 20 (USA). Sklíčko bylo vloženo do přístroje, který následně vyhodnotil množství buněk v 1 ml příslušné buněčné suspenze.

3.2.3. Příprava lyzačního pufru

Lyzační pufr používaný při přípravě vzorků pro fluorimetrické stanovení LTR i stanovení koncentrace proteinů byl připraven ve složení: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Igepal (neiontový, nedenaturační detergent). Složky lyzačního pufru byly rozpuštěny za stálého míchání v deionizované vodě a pH tohoto pufru bylo následně upraveno 2 M kyselinou chlorovodíkovou za měření pH pH-metrem CyberScan 510 pH (USA) na hodnotu 7,4.

3.2.4. Příprava vzorků buněčné linie UKF-NB-4 pro fluorimetrické stanovení koncentrace LTR

Buňky neuroblastomové linie UKF-NB-4 byly přeneseny na Petriho misky o kultivační ploše 60,1 cm². Na čtyři Petriho misky bylo pipetováno shodně 1 200 000 buněk. U dalších šesti Petriho misek bylo postupováno tak, že do první z misek bylo pipetováno 2 500 000 buněk a v každé z následujících misek byl počet buněk poloviční – počet buněk v těchto miskách byl tedy 2 500 000, 1 250 000, 625 000, 313 000, 156 000 a 78 000.

Celkový objem kompletního IMDM-média byl ve všech miskách shodný - 4 ml - a buňky byly 24 hodin inkubovány. Po 24 h byl k buňkám přidán LTR, a to v takovém množství, aby v miskách s 1 200 000 buňkami byla koncentrace LTR 400 nM, 200 nM, 100 nM a 50 nM a v miskách s proměnlivým počtem buněk byla koncentrace stejná – 200 nM. Buňky byly inkubovány s LTR po dobu 1 h při 37°C. Poté byly buňky třikrát promyty 4°C PBS a následně byly lyzovány po dobu 5 minut lyzačním pufrem. Obsah misek byl poté přemístěn do 1,5 ml zkumavek. Vzorky byly centrifugovány po dobu 20 min při 20 000xg na centrifuze Schoeller Universal 320 R (ČR). Supernatant byl dále zpracován postupem uvedeným v kapitolách 3.2.6 a 3.2.7.

3.2.5. Příprava vzorků buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ovlivněných ellipticinem pro fluorimetrické stanovení koncentrace LTR a následné stanovení proteinů

Buňky neuroblastomové linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} byly přeneseny na Petriho misky o kultivační ploše 60,1 cm². Od každé z těchto dvou linií bylo připraveno 16 misek (8 různých situací vždy v dubletu), přičemž celkový objem média v misce činil 4 ml a počet buněk na misku byl přibližně 1 milion. Buňky se nechaly „přisednout“ a po 24 h inkubace byl přidán ellipticin tak, aby bylo dosaženo koncentrací uvedených v tabulce 1. Buňky obou linií byly inkubovány s ellipticinem 24 h a následně byl k buňkám přidán LTR v koncentraci 200 nM opět podle tabulky 1. Po 1 h inkubaci s LTR bylo slito médium a buňky byly omyty 4°C PBS. Následně se buňky malým množstvím 4°C PBS sfoukaly ze dna misek a byly přeneseny do 1,5 ml zkumavek, ve kterých byly buňky centrifugovány při 300xg po dobu 5 minut. K získané buněčné peletě byl přidán zhruba dvojnásobný objem lyzačního pufru připraveného dle kapitoly 3.2.3., buněčná peleta byla opatrně resuspendována a poté centrifugována při 20 000xg po dobu 20 minut při 4°C. Získaný supernatant byl odebrán a použit pro následné stanovení fluorescence a koncentrace proteinů.

Tabulka 1 - Přehled vzorků buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} připravených pro fluorimetrické stanovení koncentrace LTR a stanovení koncentrace proteinů

Senzitivní linie – UKF-NB-4	Rezistentní linie – UKF-NB-4^{ELLI}
2 x kontrola	2 x kontrola
2 x kontrola + 200 nM LTR	2 x kontrola + 200 nM LTR
2 x 0,5 µM elli	2 x 0,5 µM elli
2 x 5 µM elli	2 x 5 µM elli

2 x 10 μ M elli	2 x 10 μ M elli
2 x 0,5 μ M elli + 200 nM LTR	2 x 0,5 μ M elli + 200 nM LTR
2 x 5 μ M elli + 200 nM LTR	2 x 5 μ M elli + 200 nM LTR
2 x 10 μ M elli + 200 nM LTR	2 x 10 μ M elli + 200 nM LTR

3.2.6. Fluorometrické stanovení koncentrace LTR

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky byl nejprve pipetován standard sloužící pro kalibraci. Nejvyšší koncentrace LTR v standardu byla 400 nM a tato koncentrace se dále zmenšovala „dvojkovou ředící řadou“. Jako blank byl použit čistý lyzační pufr. Vedle standardu byly pipetovány vlastní vzorky, přičemž organizace a popis vzorků v destičce je znázorněn v tabulce 2. Standard i vzorky byly pipetovány v tripletech, do každé jamky byl pipetován objem 100 μ l. Fluorescence byla měřena na přístroji SpectraMax i3x (USA) při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 595 nm.

Tabulka 2 - Uspořádání pipetovaných standardů a vzorků v 96-jamkové mikrotitrační destičce při stanovení fluorescence na přístroji SpectraMax i3x (USA)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	3,125 nM	6,25 nM	12,5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM	400 nM	400 nM 1,2 mil.	200 nM 1,2 mil.	100 nM 1,2 mil.
B	blank	3,125 nM	6,25 nM	12,5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM	400 nM	400 nM 1,2 mil.	200 nM 1,2 mil.	100 nM 1,2 mil.
C	blank	3,125 nM	6,25 nM	12,5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM	400 nM	400 nM 1,2 mil.	200 nM 1,2 mil.	100 nM 1,2 mil.
D	50 nM 1,2 mil.	200 nM 2,5mil.	200 nM 1,25mil.	200 nM 625k	200 nM 313k	200 nM 156k	200 nM 78k					
E	50 nM 1,2 mil.	200 nM 2,5mil.	200 nM 1,25mil.	200 nM 625k	200 nM 313k	200 nM 156k	200 nM 78k					
F	50 nM 1,2 mil.	200 nM 2,5mil.	200 nM 1,25mil.	200 nM 625k	200 nM 313k	200 nM 156k	200 nM 78k					
G												
H												

Při fluorometrickém stanovení koncentrace LTR v buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ovlivněných ellipticinem bylo postupováno podobně jako ve výše popsaném případě. Standard pro kalibraci byl připraven totožným postupem s tím rozdílem, že LTR byl pipetován v PBS, nikoliv v lyzačním pufru jako ve výše uvedeném případě a PBS tedy sloužil i jako blank. Standard i vzorky byly opět pipetovány v tripletech po 100 μ l na jamku.

Fluorescence byla opět měřena na přístroji SpectraMax i3x (USA), excitační vlnová délka byla nastavena na 570 nm a emisní vlnová délka na 620 nm.

3.2.7. Stanovení koncentrace proteinů

Vzorky proteinů získané postupem popsaným v kapitole 3.2.4. byly pro potřeby stanovení koncentrace nejprve ředěny 8x deionizovanou vodou a koncentrace byla stanovena za použití kitu „Microplate BCA Protein Assay Kit, Pierce® - Thermo Scientific™“ (USA). Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno po 5 μ l standardu, přičemž jako standard byl použit sérový hovězí albumin (BSA) o koncentraci 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 a 2,8 mg/ml, a dále po 5 μ l vzorků proteinů. Následně bylo do každé jamky se standardem nebo vzorkem přidáno 25 μ l roztoku A' (pH 11,25: 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,95% (w/v) NaHCO_3 ; 0,4% (w/v) NaOH; 0,16% (w/v) vínan sodno-draselný) (1000 μ l roztoku A + 20 μ l roztoku S – kyselina bicinchoninová) a poté 250 μ l roztoku B (4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Mikrotitrační destička se standardy a vzorky byla umístěna na laboratorní míchačku Labnet Gyro Twister (USA), kde byla za mírného míchání a laboratorní teploty inkubována 15 min. Nakonec byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm na spektrofotometru Molecular Devices VERSA max tunable microplate reader (USA). Zjištěná data byla vyhodnocena v softwaru SoftMax Pro.

3.2.8. Stanovení viability buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} po ovlivnění ellipticinem a bafilomycinem

Stanovení viability buněk bylo provedeno ve formátu 96-jamkové mikrotitrační destičky, zároveň pro obě buněčné linie - UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}. Do jamek bylo pipetováno 7 500 buněk v 50 μ l média a buňky byly následně inkubovány po dobu 24 h. Poté byl k buňkám přidán ellipticin či kombinace ellipticinu a bafilomycinu A podle schématu znázorněného v tabulce 3 na straně 31. Celkový objem v jamkách byl po přidání testovaných látek 100 μ l. Po 24 h inkubaci bylo do všech jamek kromě kontroly pipetováno 10 μ l „AlamarBlue™ Cell Viability Reagent“ a buňky byly následně ještě 2 h inkubovány. Tato látka je redoxní indikátor, který mění barvu a fluorescenci jako odpověď na metabolickou aktivitu buněk, která jej redukuje [63]. Poté byla měřena fluorescence na přístroji SpectraMax i3x (USA) při excitační vlnové délce 570 nm a emisní vlnové délce 585 nm.

Tabulka 3 – Schematické znázornění jednotlivých situací při měření viability vzorků v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Tatáž situace je vždy měřena pro buňky linie UKF-NB-4 (horní polovina tabulky) i UKF-NB-4^{ELLI} (dolní polovina tabulky). V prvním sloupci je měřeno samotné médium, v desátém sloupci médium s alamarBlue. baf A – bafilomycin A, elli – ellipticin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		
B	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		
C	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		
D	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		
E	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		
F	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		
G	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		
H	m	ctrl	baf A	0,5μM elli	5μM elli	10μM elli	0,5μM elli + baf A	5μM elli + baf A	10μM elli + baf A	m		

4. Výsledky

Předkládaná bakalářská práce se zabývá problematikou lysosomální sekvestrace - jevem vyskytujícím se u látek vykazujících vlastnosti hydrofobních slabých bazí. Při lysosomální sekvestraci se tyto látky dostávají přes cytoplazmatickou membránu do neutrálního cytosolu, odkud mohou dále volně difundovat do dalších vnitrobuněčných kompartmentů včetně lysosomů. Při průniku do kyselého prostředí lysosomálního lumen ovšem dochází k jejich protonaci a tyto molekuly již nemohou volně difundovat z lysosomu zpět do cytosolu – jinými slovy dochází k jejich sekvestraci uvnitř lysosomů.

Mnohá protinádorová léčiva jsou hydrofobní slabě bazické látky a jsou tím pádem předmětem sekvestrace uvnitř lysosomů. V důsledku tohoto jevu dané látky nejsou k dispozici v místech, kde má dojít k interakci s jejich buněčnými cíli (cytosol/jaderná DNA) a vzniká rezistence.

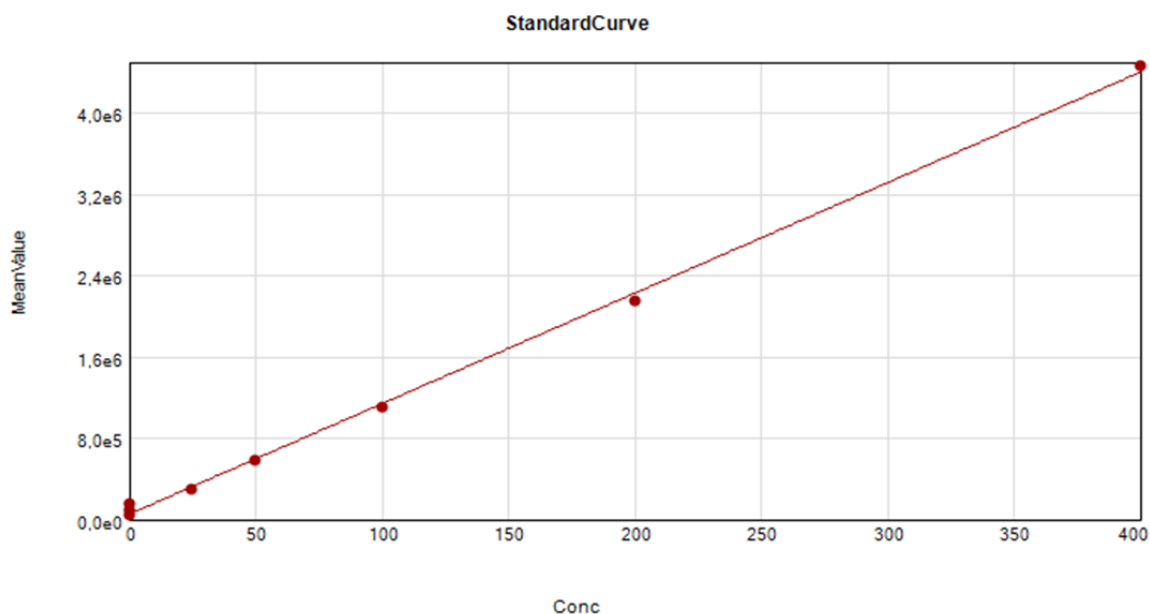
Buňky neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} byly zkoumány z hlediska lysosomálního „uptaku“ s cílem stanovit jejich kapacitu, kdy bylo využíváno fluorescenčních vlastností pro kyselé organely (lysosomy) selektivní fluorescenční barvy LysoTracker Red (LTR). Byl také zkoumán způsob, jakým tento proces ovlivňuje specifický inhibitor V-ATPasy, bafilomycin A.

4.1. Fluorescenční stanovení koncentrace LTR v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 při proměnlivé koncentraci LTR či proměnlivém počtu buněk

Pro vypracování bakalářské práce bylo nejprve nutné zavést zvolenou metodu fluorescenčního stanovování LTR. Pro zjištění funkčnosti této metody byly opakovaně připraveny experimenty s buněčnou linií UKF-NB-4 podle postupu popsaného v kapitole 3.2.6. a byla sledována závislost fluorescence v prvním případě na koncentraci LTR ve vzorku a v případě druhém na počtu buněk.

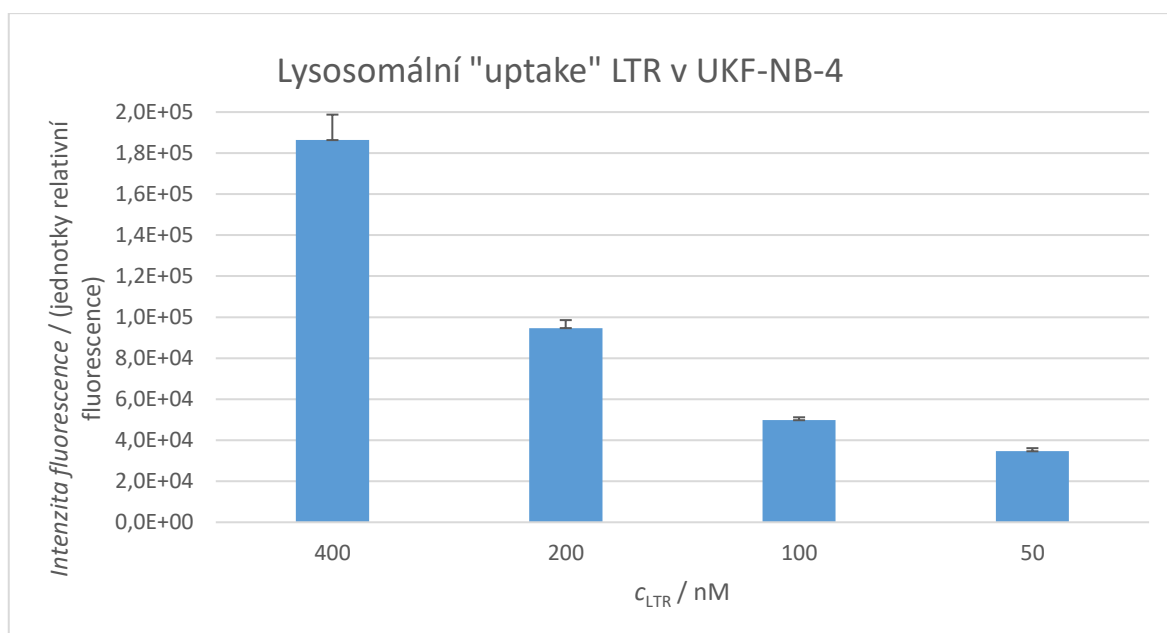
Nejprve byla ze závislosti intenzity fluorescence na koncentraci LTR standardu sestrojena kalibrační křivka (viz obrázek 8), která vykazovala jasnou lineární závislost, a

kteřá byla dále použita pro fluorescenční stanovení koncentrace LTR v jednotlivých vzorcích buněk.



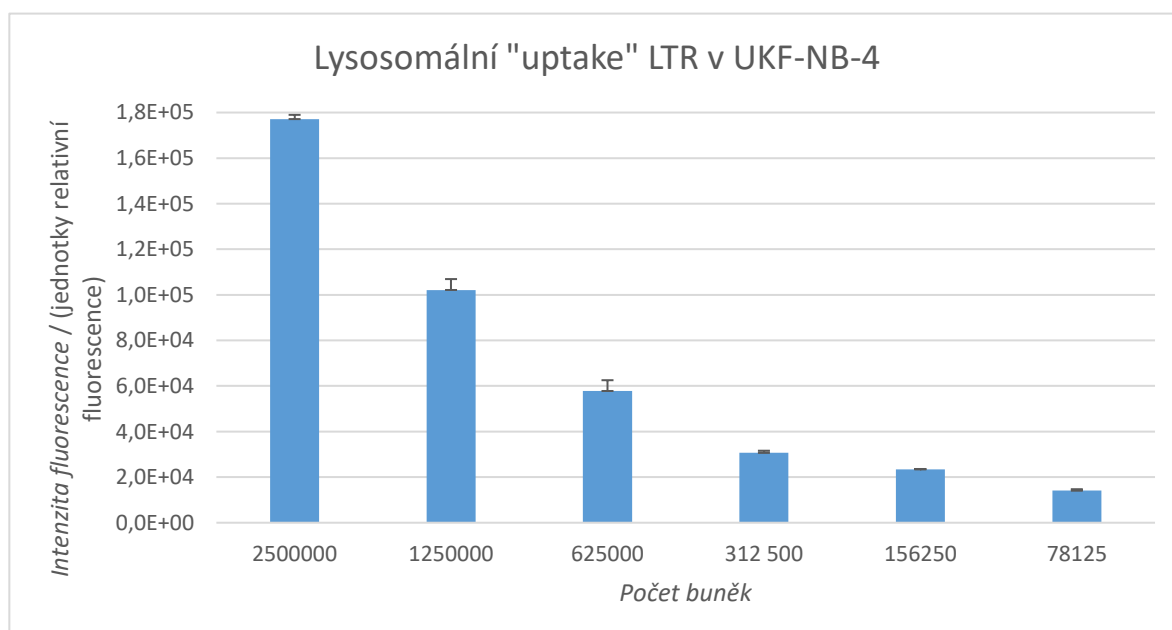
Obrázek 8 - Kalibrační křivka závislosti intenzity fluorescence na koncentrace LTR

Na obrázku 9 (na straně 34) je patrné, že hodnoty zjištěné intenzity fluorescence se přímo úměrně zmenšují s klesající koncentrací LTR ve vzorcích analyzovaných buněk, a tedy že závislost intenzity fluorescence na koncentraci LTR je lineární, ve shodě s naším očekáváním.



Obrázek 9 - Závislost intenzity fluorescence na proměnlivé koncentraci LTR ve vzorcích analyzovaných buněk linie UKF-NB-4. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměrem tří měření.

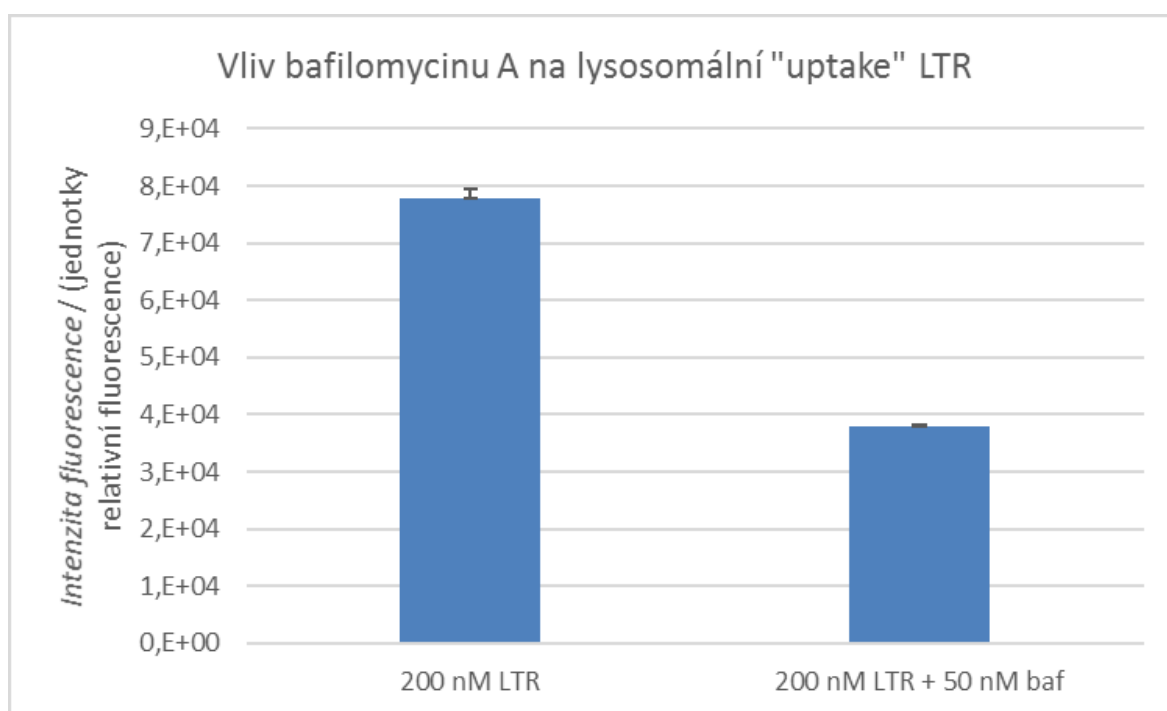
Podobná závislost intenzity fluorescence byla získána i při použití proměnlivého počtu buněk při konstantní koncentraci LTR, jak je patrné na obrázku 10. Intenzita fluorescence i v tomto případě přímo úměrně klesá s klesajícím počtem buněk.



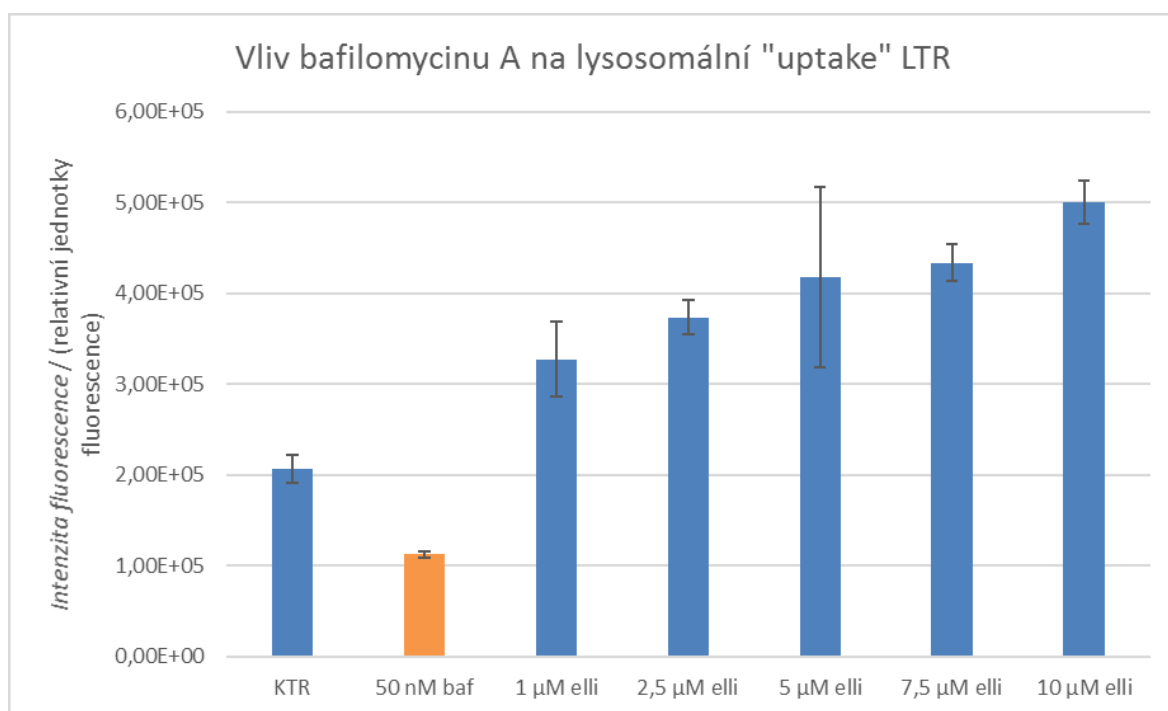
Obrázek 10 - Závislost intenzity fluorescence na proměnlivém počtu buněk v analyzovaných vzorcích buněk linie UKF-NB-4. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměrem tří měření.

4.2. Vliv bafilomycinu A na lysosomální „uptake“ LTR v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4

Bafilomycin A jako specifický inhibitor V-ATPasy významně ovlivňuje lysosomální „uptake“ LTR. Jeho vliv byl v tomto případě zjišťován tak, že před přidáním LTR byly buňky nejprve 30 minut inkubovány s 50 nM bafilomycinem A a teprve poté proběhla inkubace s LTR trvající 1 h. Rozdíl v akumulaci LTR v buňkách bez bafilomycinu A a v buňkách ovlivněných 50 nM bafilomycinem A je jasně zřetelný na obrázku 11 (na straně 35) a na obrázku 12 (na straně 36).



Obrázek 11 - Vliv 50 nM bafilomycinu A na lysosomální „uptake“ LTR buněčné linie UKF-NB-4. Experiment byl proveden na 1 200 000 buněk a koncentrace LTR byla 200 nM. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměrem technického triplikátu.

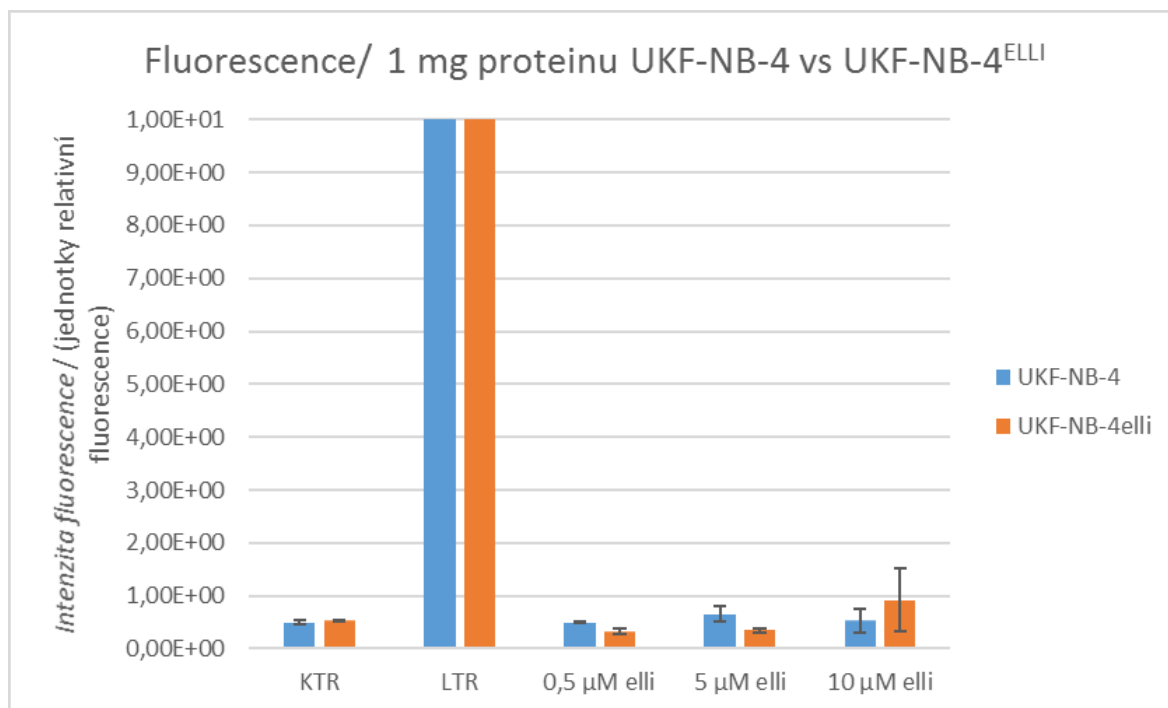


Obrázek 12 – Vliv 50 nM bafilomycinu A na lysosomální „uptake“ LTR buněčné linie UKF-NB-4. Experiment byl proveden na 1 200 000 buněk a koncentrace LTR byla 200 nm. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměrem technického triplikátu.

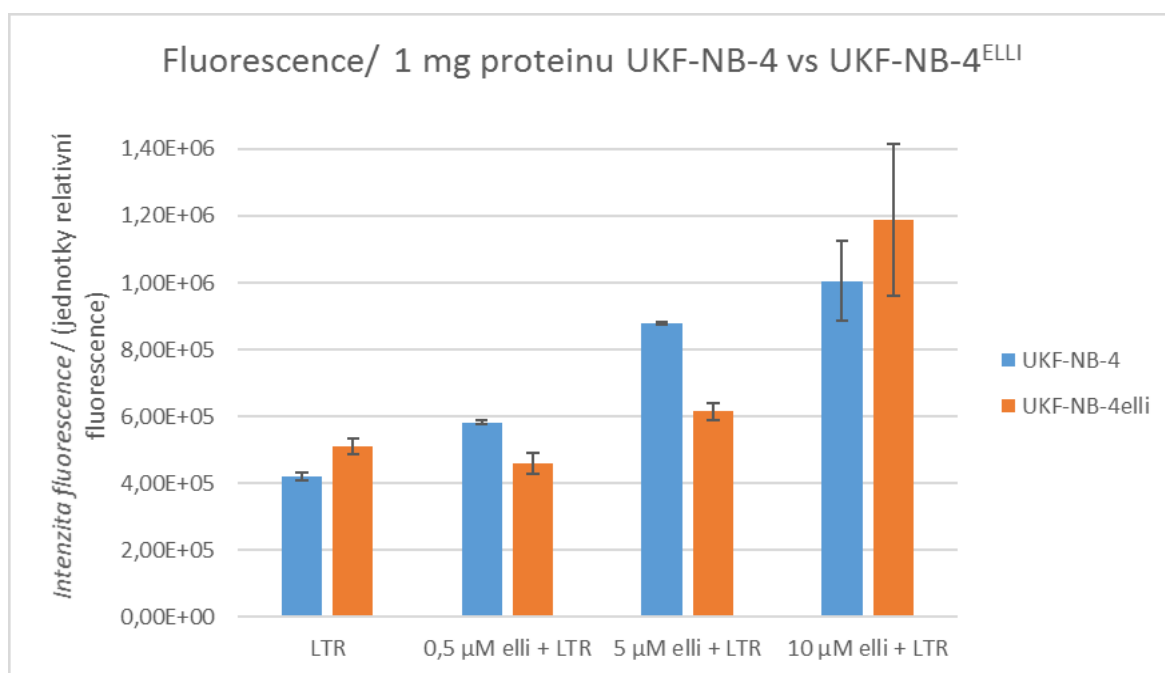
4.3. Lysosomální „uptake“ LTR v neuroblastomových liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ovlivněných ellipticinem

Při tomto experimentu byl sledován rozdíl v lysosomální sekvestraci LTR mezi neuroblastomovými buněčnými liniemi UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}. U obou buněčných linií byla nejprve měřena intenzita fluorescence na přístroji SpectraMax i3x (USA), která byla následně vztažena na koncentraci proteinů ve vzorcích, čímž byly získány hodnoty uvedené v obrázku 14 (na straně 38).

Pro vyloučení fluorescence ellipticinu, která by zkreslovala výsledky měření, při zvolené excitační a emisní vlnové délce, byly v experimentu sledovány situace, při kterých byly vzorky buněk ovlivněny pouze ellipticinem bez inkubace s LTR. Jak je vidět na obrázku 13 (na straně 37), intenzita fluorescence LTR v buňkách je v těchto případech srovnatelná s kontrolou bez ellipticinu či LTR.



Obrázek 13 – Porovnání intenzity fluorescence normalizované na koncentraci proteinu pro buňky ovlivněné pouze ellipticinem bez přídavku LTR a buňky ovlivněné LTR. Na ose y je zvoleno takové měřítko, aby byly hodnoty kontroly a vzorků ovlivněných pouze ellipticinem rozeznatelné. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměrem technického triplikátu.



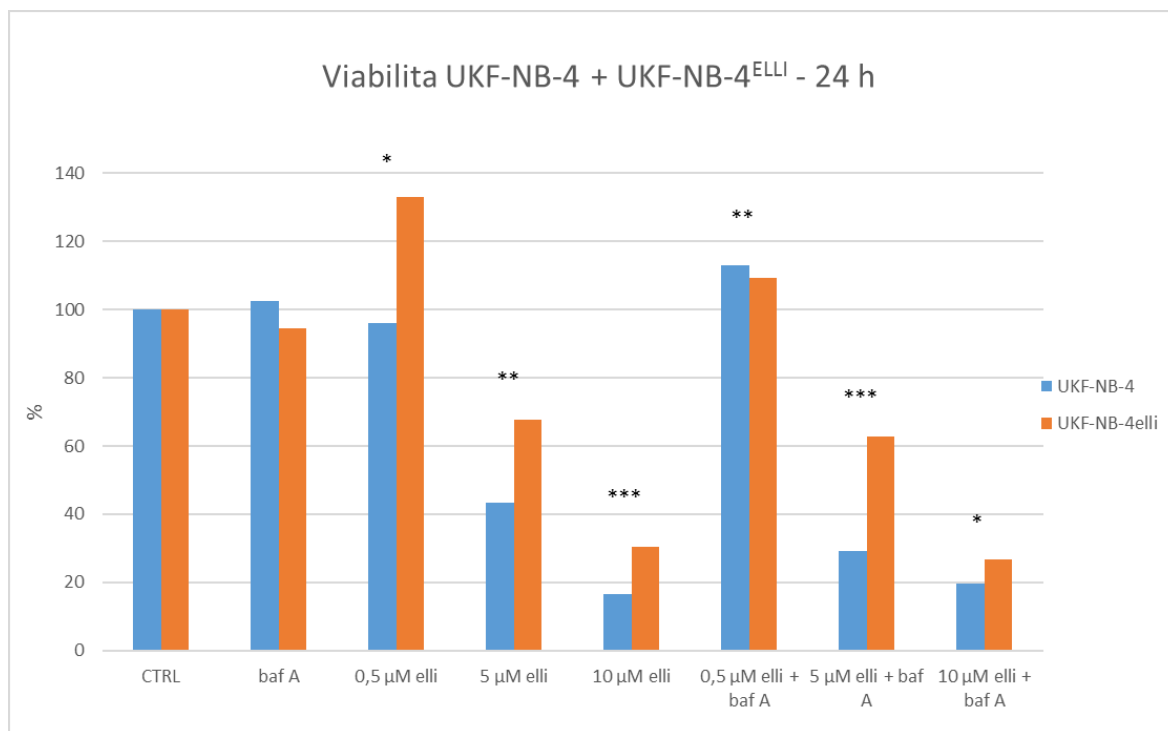
Obrázek 14 – Závislost intenzity fluorescence normalizované na koncentraci proteinu na koncentraci ellipticinu pro buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměrem technického triplikátu.

Výsledky měření jasně ukazují, že při použitých koncentracích ellipticinu (vyšší koncentrace jsou pro buňky neúnosně toxické) platí, že čím je vyšší koncentrace použitého ellipticinu, tím větší je intenzita fluorescence LTR v buňkách vztažená na koncentraci proteinu – a tím větší je tedy i lysosomální „uptake“ LTR, tedy kapacita lysosomů. Toto platí jak v senzitivní linii UKF-NB-4, tak v linii rezistentní UKF-NB-4^{ELLI}, jak lze vidět na obrázku 13.

4.4. Stanovení vlivu bafilomycinu A a ellipticinu na viabilitu buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}

Výsledky měření viability buněk po inkubaci s bafilomycinem A a ellipticinem ukazují, že viabilita v obou liniích je srovnatelná. Ani u jedné z použitých buněčných linií nebylo zaznamenáno významné snížení viability po působení bafilomycinu A. Naopak, v obou liniích byl jasně pozorován vliv ellipticinu na viabilitu, kdy použité koncentrace 5 μM a 10 μM působící po dobu 24 h významným způsobem snížily viabilitu buněk, a to ve druhém případě až na úroveň zhruba 20 %, jak je vidět na obrázku 15 (na straně 39). Z výsledků také vyplynulo, že pokud buňky ovlivníme současně ellipticinem i bafilomycinem A, dochází k potenciaci účinků ellipticinu v buněčné linii UKF-NB-4

v případě 5 μ M koncentrace ellipticinu a v UKF-NB-4^{ELLI} v případě koncentrací 5 μ M a 10 μ M. Dále je zjevné, že větší účinnosti je dosaženo u senzitivní linie UKF-NB-4.



Obrázek 135 – Stanovení viability buněk ovlivněných bafilomycinem A, ellipticinem, či jejich kombinací. Hodnoty jsou průměrem měření v technických kvadrupletech. Měření jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,2$ znázorněna *, signifikance $p < 0,05$ znázorněna **, signifikance $p < 0,005$ znázorněna ***.

5. Diskuze

V této bakalářské práci byl sledován lysosomální „uptake“ barviva LysoTracker Red (LTR). LTR je selektivní fluorescenční barva mající vlastnosti hydrofobních slabých bazí, která se akumuluje v lysosomech, a díky fluorescenčním vlastnostem je možné tuto látku s výhodou využít pro experimenty jako simulaci léčiv s již zmíněnými vlastnostmi.

V experimentech byl sledován vliv bafilomycinu A na lysosomální „uptake“ LTR neuroblastomové linie UKF-NB-4. Zjistili jsme, že již třicetiminutová preinkubace této linie s 50 nM bafilomycinem A umožňuje snížení lysosomálního „uptaku“ na 50 % původní hodnoty. To představuje potenciál pro snížení MDR, která je závažnou překážkou v léčbě některých nádorových onemocnění. Díky snížení lysosomální sekvestrace je léčivo k dispozici v místech, kde je žádoucí interakce se specifickým buněčným cílem.

Z měření intenzity fluorescence normalizované na množství proteinů vyplývá, že čím vyšší je koncentrace ellipticinu použitého při ovlivnění buněk (minimálně v rozsahu použitých koncentrací), tím více LTR se akumuluje v lysosomech. To je v souladu s předpokladem, že ellipticin je jako látka s lysosomotropními vlastnostmi zachytáván v lysosomech [7], kde se akumuluje a indukuje lysosomální biogenezi prostřednictvím transkripčního faktoru TFEB. Větší množství nově vzniklých lysosomů je schopné zachytit větší množství LTR, a tomu odpovídají získané výsledky. Tento trend pokračoval až ke koncentraci ellipticinu 10 μ M, což je pravděpodobně dáno způsobem, jakým se postupovalo – po inkubaci buněk s LTR byly buňky na miskách omyty, čímž došlo k odstranění „nepřisedlých“ mrtvých buněk. Analýza tedy probíhala pouze na živých přisedlých buňkách a díky normalizaci intenzity fluorescence na koncentraci proteinu může mít závislost takový průběh. Koncentrace ellipticinu 10 μ M je již velmi cytotoxická, což je patrné z výsledků experimentů sledujících viabilitu buněk. Z měření vyplývá, že největší lysosomální „uptake“ vykazují buňky ovlivněné 10 μ M ellipticinem. Při tomto stanovení byly kontrolně měřeny i buňky inkubované pouze s ellipticinem a nikoliv s LTR. K tomuto kroku bylo přistoupeno z důvodu, že výsledná rostoucí lineární závislost mohla být částečně způsobena i fluorescencí ellipticinu, jehož excitační a emisní spektrum je blízké LTR, a způsobit tak zkreslení výsledků. Toto podezření bylo ale provedeným měřením vyvráceno. Co se týká srovnání linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}, dala by se předpokládat vyšší hodnota intenzity fluorescence normalizované na protein u UKF-NB-4^{ELLI}. To je však patrné jen u buněk

inkubovaných se samotným LTR a pak v experimentu, kde byly buňky vystaveny působení 10 μM ellipticinu, kde je však zároveň poměrně velká směrodatná odchylka zjištěných dat.

Stanovení viability buněk jasně ukázalo, že vystavení buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB4^{ELLI} po dobu 24 h 5 μM a 10 μM koncentracím ellipticinu bylo pro buňky smrtelné. To je zdokumentováno významným snížením viability buněk – v případě 10 μM koncentrace se jedná o snížení až na úroveň cca 20 %. Ani u jedné z linií nemá samotný bafilomycin A vliv na viabilitu. V situacích, kdy je současně prováděna inkubace ellipticinem i bafilomycinem A, by teoreticky mělo dojít ke snížení viability, a to z toho důvodu, že bafilomycin A jako specifický inhibitor V-ATPasy narušuje transport H^+ do lysosomů. To vede následně k alkalizaci lysosomů a acidifikaci cytosolu a výsledkem je snížení pH gradientu mezi lysozomem a cytosolem. Tak by měla být zajištěna možnost působit v cílovém místě, v případě ellipticinu tvořit adukty DNA v jádře, a tím snižovat viabilitu buněk. Potenciace vývoje apoptózy generované ellipticinem bafilomycinem A již byla potvrzena experimentálně [7, 64]. Potenciace účinku ellipticinu bafilomycinem A se u měření viability projevila významnějším způsobem pouze u linie UKF-NB-4, a to konkrétně u 5 μM koncentrace ellipticinu. Při porovnání viability linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} se projevuje rezistence UKF-NB-4^{ELLI} nižším účinkem ellipticinu na viabilitu těchto buněk. V linii UKF-NB-4^{ELLI} se stanovení viability zmíněným pozorovaným trendům na první pohled vymyká vzorek ovlivněný 0,5 μM ellipticinem. Z toho důvodu by bylo vhodné potvrdit předkládané výsledky opakováním experimentu.

6. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium lysosomálního „uptaku“ barviva LysoTracker Red (LTR) v buněčné linii UKF-NB-4 a od ní odvozené linii UKF-NB-4^{ELLI} rezistentní k ellipticinu. V práci se dospělo k následujícímu:

- byla zavedena a standardizována metoda měření lysosomálního „uptaku“ LTR ke stanovení kapacity lysosomu pro tento proces
- experimentálně bylo dokázáno, že bafilomycin A jako specifický inhibitor V-ATPasy je schopný snížit lysosomální „uptake“ LTR minimálně o 50 %, což představuje možnost pro významné zvýšení efektivity léčby některých nádorových onemocnění a boj proti lékové rezistenci
- největší lysosomální „uptake“ LTR přeživšími buňkami linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} byl opakovaně zjištěn při inkubaci s 10 μ M ellipticinem
- zjištěna byla potenciace účinků 5 μ M ellipticinu 50 nM bafilomycinem A v neuroblastomové linii UKF-NB-4

Seznam literatury

- [1] Shewach, D.S., Kuchta, R.D.: Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chemical Reviews*. 2009, **109**, 2859-2861
- [2] Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C.R.: Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013, **65**, 157-170
- [3] Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika - nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. Doktorská disertační práce. Slovenská akadémia vied. Bratislava, 2004
- [4] Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villaneuva, A., Vinals, F., Capella, G.: Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*. 2010, **16**, 3-10
- [5] Baudino, T.: Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*. 2015, **12**, 3-20
- [6] Eckschlager, T., Koutecký, J.: Solidní nádory u dětí a mladistvých. *Vesmír*. 2004, **83**, 436-440
- [7] Hraběta, J., Groh, T., Khalil, M., Poljaková, J., Adam, V., Kizek, R., Uhlík, J., Doktorová, H., Černá, T., Frei, E., Stiborová, M., Eckschlager, T.: Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *International Journal of Oncology*. 2015, **47**, 971-980
- [8] Vermeulen, J., Preter, K.D., Mestdagh, P., Laureys, G., Speleman, F., Vandesompele, J.: Predicting Outcomes for Children with Neuroblastoma. *Discovery Medicine*. 2010, **10**, 29-36
- [9] Maris, J.M.: Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2010, **362**, 2202-2211
- [10] Štěrbá, J., Mazánek, P., Bajčiová, V.: Pokroky v diagnostice a léčbě neuroblastomu u dětí. *Postgraduální medicína*. 2004, **4**, 373-379
- [11] Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R., Cohn, S.L.: Neuroblastoma. *The Lancet*. 2007, **369**, 2106-2120
- [12] Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., Evans, A.E.: Trk Receptor Expression and Inhibition in Neuroblastomas. *Clinical Cancer Research*. 2009, **15**, 3244-3250
- [13] Huang, M., Weiss, W.A.: Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013, **3**, 1-22
- [14] Abel, F., Ejeskär, K., Kogner, P., Martinsson, T.: Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavourable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2 (SSTR2) gene at 17q24. *British Journal of Cancer*. **81**, 1402-1409
- [15] DeVita, V.T., Chu, E.: A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*. 2008, **68**, 8643-8653
- [16] Wilman, D.E.: The Chemistry of Antitumour Agents. *Springer Science & Business Media*. 2012, 35

- [17] Minnoti, G., Manna, P., Salvatorelli, E., Carro, G., Gianni, L.: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 2004, **56**, 185-229
- [18] Bartlett, J.J., Trivedi, P.C., Pulinikunni, T.: Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2017, **104**, 1-8
- [19] Arcamone, F., Animati, F., Capranico, G., Lombardi, P., Pratesi, G., Manzini, S., Supino, R., Zunino, F.: New developments in antitumor anthracyclines. *Pharmacology and Therapeutics*. 1997, **76**, 117-124
- [20] Stiborová, M., Rupertová, M., Frei, E.: Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, **1814**, 175-185
- [21] Stiborová, M., Frei, E.: Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Current Medicinal Chemistry*. 2014, **21**, 575-591
- [22] Stiborová, M., Poljaková, J., Mrizova, I., Bořek-Dohalská, L., Eckschlager, T., Adam, V., Kizek, R., Frei, E.: Expression Levels of Enzymes Metabolizing an Anticancer Drug Ellipticine Determined by Electromigration Assays Influence its Cytotoxicity to Cancer Cells – A Comparative Study. *International Journal of Electrochemical Science*. 2014, **9**, 5675-5689
- [23] Poljaková, J., Eckschlager, T., Hraběta, J., Hrebacková, J., Smutný, S., Frei, E., Martínek, V., Kizek, R., Stiborová, M.: The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 2009, **77**, 1466-1479
- [24] Dasari, S., Tchounwoun, P.B.: Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014, **740**, 364-378
- [25] Beck, D.J., Brubaker, R.R.: Effect of cis-Platinum(II)Diamminodichloride on Wild Type and Deoxyribonucleic Acid Repair-Deficient Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1973, **116**, 1247-1252
- [26] Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G.: Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012, **31**, 1869-1883
- [27] Go, R.S., Adjei, A.A.: Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *Journal of Clinical Oncology*. 1999, **17**, 409-422
- [28] Duvvuri, M., Gong, Y., Chatterji, D., Krise, J.P.: Weak base permeability characteristics influence the intracellular sequestration site in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**, 32367-32372
- [29] Ndolo, R.A., Luan, Y., Duan, S., Forrest, M.L., Krise, J.P., Lebedeva, I.V.: Lysosomotropic Properties of Weakly Basic Anticancer Agents Promote Cancer Cell Selectivity In Vitro. *PLoS ONE*. 2012, **7**, 1-9
- [30] Kaufmann, A.M., Krise, J.P.: Lysosomal Sequestration of Amine-Containing Drugs: Analysis and Therapeutic Implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, **96**, 729-746
- [31] Kazmi, F., Hensley, T., Pope, C., Funk, R.S., Loewen, G.J., Buckley, D.B., Parkinson, A.: Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells). *Drug Metabolism and Disposition*. 2013, **41**, 897-905

- [32] Schwartz, A.L., Hollingdale, M.R.: Primaquine and lysosomotropic amines inhibit malaria sporozoite entry into human liver cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1985, **14**, 305-311
- [33] Duvvuri, M., Krise, J.P.: Intracellular drug sequestration events associated with the emergence of multidrug resistance: a mechanistic review. *Frontiers in Bioscience*. 2005, **10**, 1499-1509
- [34] Ndolo, R.A., Jacobs, D.T., Forrest, M.L., Krise, J.P.: Intracellular Distribution-based Anticancer Drug Targeting: Exploiting a Lysosomal Acidification Defect Associated with Cancer Cells. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2010, **2**, 131-136
- [35] DeCiccio, J., Steinberg, B.E.: Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *The Journal of General Physiology*. 2011, **137**, 385-390
- [36] Altan, N., Chen, Y., Schindler, M., Simon, S.M.: Defective Acidification in Human Breast Tumor Cells and Implications for Chemotherapy. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998, **187**, 1583-1598
- [37] Robinson, R.L., Visscher, G.E., Roberts, S.A., Engstrom, R.G., Hartman, H.A., Ballard, F.H.: Generalized phospholipidosis induced by an amphiphilic cationic psychotropic drug. *Toxicologic Pathology*. 1985, **13**, 335-348
- [38] Guigui, B., Perrot, S., Berry, J.P., Fleury-Feith, J., Martin, N., Métreau, J.M., Dhumeaux, D., Zafrani, E.S.: Amiodarone-induced hepatic phospholipidosis: a morphological alteration independent of pseudoalcoholic liver disease. *Hepatology*. 1988, **8**, 1063-1068
- [39] Anderson, N., Borlak, J.: Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters*. 2006, **580**, 5533-5540
- [40] Kodavanti, U.P., Mehendale, H.M.: Cationic amphiphilic drugs and phospholipid storage disorder. *Pharmacological Reviews*. 1990, **42**, 327-354
- [41] Reasor, M.J., Kacew, S.: Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Experimental Biology and Medicine*. 2001, **226**, 825-830
- [42] Duvvuri, M., Konkar, S., Funk, R.S., Krise, J.M., Krise, J.P.: A Chemical Strategy To Manipulate the Intracellular Localization of Drugs in Resistant Cancer Cells †. *Biochemistry*. 2005, **44**, 15743-15749
- [43] Zhitomirsky, B., Assaraf, Y.G.: Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*. 2016, **24**, 23-33
- [44] Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., Saftig, P.: At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in Cell Biology*. 2003, **13**, 137-145
- [45] Zhitomirsky, B., Assaraf, Y.G.: Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget*. 2014, **6**, 1143-1156
- [46] Goldman, S.D., Funk, R.S., Rajewski, R.A., Krise, J.P.: Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes. *Bioanalysis*. 2009, **1**, 1445-1459
- [47] Hurwitz, S.J., Terashima, M., Mizunuma, N., Slapak, C.J.: Vesicular Anthracycline Accumulation in Doxorubicin-Selected U-937 Cells: Participation of Lysosomes. *Blood*. 1997, **89**, 3745-3754

- [48] Gotink, K.J., Broxterman, H.J., Labots, M., de Haas, R.R., Dekker, H., Honeywell, R.J., Rudek, M.A., Beerepoot, L.V., Musters, R.J., Jansen, G., Griffioen, A.W., Assaraf, Y.G., Pili, R., Peters, G.J., Verheul, H.M.: Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. *Clinical Cancer Research*. 2011, **17**, 7337-7346
- [49] Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., Facchinetti, V., Sabatini, D.M., Ballabio, A.: A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal*. 2012, **31**, 1095-1108
- [50] Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., Ballabio, A.: Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics*. 2011, **20**, 3852-3866
- [51] Huss, M., Vitavska, O., Albertmelcher, A., Bockelmann, S., Nardmann, C., Tabke, K., Tiburcy, F., Wiczorek, H.: Vacuolar H⁺-ATPases: Intra- and intermolecular interactions. *European Journal of Cell Biology*. 2011, **90**, 688-695
- [52] Chan, C.Y., Dominguez, D., Parra, K.J.: Regulation of Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) Reassembly by Glycolysis Flow in 6-Phosphofructo-1-kinase (PFK-1)-deficient Yeast Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, **291**, 15820-15829
- [53] McGuire, Ch., Cotter, K., Stransky, L., Forgac, M.: Regulation of V-ATPase assembly and function of V-ATPases in tumor cell invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2016, **1857**, 1213-1218
- [54] Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., Forgac, M.: Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2001, **98**, 12397-12402
- [55] Oot, R.A., Wilkens, S.: Subunit interactions at the V1-V0 interface in yeast vacuolar ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, **287**, 13396-13406
- [56] Bond, S., Forgac, M.: The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H⁺)-ATPase in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, **283**, 36513-36521
- [57] Hinton, A. Bond, S., Forgac, M.: V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 2009, **457**, 589-598
- [58] Huss, M., Wiczorek, H.: Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *Journal of Experimental Biology*. 2009, **212**, 341-346
- [59] Huang, L., Albers-Schonberg, G., Monaghan, R.L., Jakubas, K., Pong, S.S., Hensens, O.D., Burg, R.W., Ostlind, D.A., Conroy, J., Stapley, E.O.: Discovery, production and purification of the Na⁺, K⁺ activated ATPase inhibitor, L-681, 110 from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. MA-5038. *The Journal of Antibiotics*. 1984, **37**, 970-975
- [60] Pérez-Sayáns, M., Somoza-Martín, J.M., Barros-Angueira, F., Rey, J.M.G., García-García, A.: V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 2009, **35**, 707-713
- [61] Bowman, E.J., Bowman, B.J.: V-ATPases as Drug Targets. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2005, **37**, 431-435

[62] Procházka, P., Libra, A., Zemanová, Z., Hřebacková, J., Poljaková, J., Hraběta, J., Bunčec, M., Stiborová, M., Eckschlager, T.: Mechanisms of ellipticine-mediated resistance in UKF-NB-4 neuroblastoma cells. *Cancer Science*. 2012, **103**, 334-341

[63] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025> [cit. 13.5.2017]

[64] Belhajová, M.: Význam V-ATPasy v rezistenci k cytostatikům a možnosti její inhibice. Diplomová práce. PřF UK, Praha 2016

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]